

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**DIVERSIDAD BIOSINTÉTICA EN *S. diastaticus* var.
108 Y SUS RECOMBINANTES GENÉTICOS:
MEJORAS FARMACOLÓGICAS DE ANTIBIÓTICOS
MACRÓLIDOS POLIENOS**

TESIS DOCTORAL

LETICIA ESCUDERO CRUJERA

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)

Madrid 2010

Memoria presentada por Leticia Escudero Crujera para optar al grado de
Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis:

Tutor de Tesis:

Dr. Francisco Malpartida Romero

Dr. M. Graciela Pucciarelli

ABSTRACT

Nowadays, systemic fungal infection is considered to be an important problem to immunocompromised patients (antitumor drug applications, AIDS, organ transplantation, etc) and the threat increases due to limitation on antifungal agents available to fight mycoses. Amphotericin B is the preferred first-line drug for treatment of several systemic fungal infections, this polyene macrolide show good and broad antifungal activity; in addition, is remarkable its low rate of resistant strains even after 50 years in clinical use. However its use is limited because the high toxicity derived from the low water solubility and the interaction with cholesterol in mammalian membranes. Several attempts have been realized to solving this problem, construction of semisynthetic and genetically engineered derivatives. These polyene macrolide have contributed to the current knowledge of the structure-activity relationships. It has been demonstrated that modification in the exocyclic carboxyl group of the macrolactone ring and/or the amino group of the mycosamine sugar of polyenes increase both antimicrobial activity and water solubility and low toxicity. Genetic manipulation is considered a good way to generate new polyene macrolide with pharmacological improved properties. *S. diastaticus* var. 108 is a producer of the two polyenes, rimocidin and CE-108, the inactivation of the *rimJ* gene in *S. diastaticus* var. 108 increased yield of others closely related tetraenes: rimocidin D and CE-108D. The elucidation of the chemical structures of these compounds revealed the versatility of loading module, RimA, to choose so only acetyl CoA or butyryl CoA, but also propionyl CoA as starter unit, and the 5 module to choose ethylmalonyl CoA and methylmalonyl CoA as elongation unit. The versatility of biosynthetic polyene pathway in *S. diastaticus* var.108 has been used in this work to analyze other loading modules, PimS0 and NysA, to choose one or more starter units. The activity of *pcsA* gene product, involve in a tailoring activity for the conversion “in vivo” the polyene macrolides in *S.diastaticus* var.108 is quite low in wild type strain. The *rimJ* disruption and amidotransferase carried mutant allowed the isolation of two new compounds: rimocidin E y CE-108 E which are amide derivative from rimocidin D y CE-108D respectively. This new amide compounds have showed improved pharmacological properties,such as increase in the selective toxicity toward ergosterol-containing membranes. Finally, we could have seen that the low tetraene amides production in *S. diastaticus* var. 108 is probably due to lack of synchronization between expression of *rimA* and *pcsA* genes

Abreviaturas

Aa	aminoácido
ACP	proteína transportadora de grupos acilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADN_C	ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	ácido ribonucleico
ARN_m	ácido ribonucleico de mensajero
ARO	aromatasa
AT	aciltransferasa
ATCC	Colección Americana de Cultivos
ATP	adenosina 5'-trifosfato
β-ME	β-mercaptoetanol
CCR	crotonil-CoA reductasa
CECT	Colección Española Cultivos Tipo
CLF	Chain Length Factor
CMI	concentración mínima inhibitoria
CoA	coenzima A
CoL	ácido carboxílico CoA: ligasa
Cys	cisteína
DH	dehidratasa
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etilendinitrilo tetracético
EIMS	espectroscopía de masas de impacto electrónico
ER	enoilreductasa
FAS	sintasa de ácidos grasos de cadena larga

His	histidina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Kb	kilobase
KR	cetoreductasa
KS	β -cetoacil sintasa
Mb	megabase
Oligo	oligonucleotido
PABA	acido p-aminobenzoico
Pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PermE*	promotor de eritromicina
PKS	poliquétido sintasa
PMSF	fluoruro de phenylmethylsulfonyl
RMN	resonancia magnética nuclear
PnysA	promotor de Nistatina
r.p.m	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato sódico
TBE	buffer Tris-Borato-EDTA
TE	tioesterasa
TES	ácido (N-tris[Hydroxymethyl-2-Aminoetanosulfónico
XysAp	promotor de silanasa

Índice

1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 <i>Streptomyces</i>	6
1.1.1 Características generales	6
1.1.2 Ciclo de vida	6
1.1.3 Organización genómica	8
1.2 Metabolitos secundarios	9
1.2.1 Generalidades	9
1.2.2 Metabolitos secundarios con actividad antibiótica	10
1.3 Poliquétidos	12
1.3.1 Síntesis de poliquétidos: mecanismo biosintético de las PKSs	12
1.3.1.1 Tipos de PKSs	14
1.3.2 Clasificación de poliquétidos	16
1.4 Macrólidos polienos	18
1.4.1 Biosíntesis de los macrólidos polienos	19
1.4.1.1 Organización génica y mecanismo enzimático de las PKS Tipo I	19
1.4.1.2 Modificaciones de adorno	23
1.4.1.2.1 Amidotransferasas de polienos	24
1.4.2 Estructura química de los macrólidos polienos	26
1.4.3 Mecanismo de acción de los macrólidos polienos	27
1.4.4 Aplicaciones de los macrólidos polienos	28
1.4.4.1 Situación clínica actual de las infecciones fúngicas	29
1.5 Desarrollo de nuevos antifúngicos macrólidos polienos	31
1.6 Antecedentes y objetivos de este trabajo	35
2 MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.1 Vectores	42
2.2 Microorganismos utilizados	46
2.2.1 Crecimiento y conservación	49
2.2.2 Medios de cultivo de <i>E. coli</i>	50
2.2.3 Medios de cultivo de <i>Streptomyces</i>	50
2.2.4 Otros medios de cultivo	50
2.3 Selección con antibiótico	51

2.4	Reactivos.....	51
2.5	Aislamiento de ADN.....	52
2.5.1	Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	52
2.5.2	Aislamiento de ADN plasmídico de <i>Streptomyces</i> .:.....	52
2.5.3	Aislamiento de ADN total de <i>Streptomyces</i>	52
2.6	Aislamiento de ADN de fagos de <i>Streptomyces</i>	52
2.7	Obtención de alto título de fago.....	52
2.8	Introducción de ADN.....	52
2.8.1	Transformación de <i>E. coli</i>	52
2.8.2	Transformación de <i>Streptomyces</i>	53
2.8.3	Transfección de <i>Streptomyces</i>	53
2.8.4	Infección en <i>Streptomyces</i>	53
2.9	Manipulación enzimática del ADN.....	53
2.9.1	Digestión del ADN.....	53
2.9.2	Desfosforilación de extremos cohesivos.....	53
2.9.3	Ligación de fragmentos de ADN.	54
2.9.4	Amplificación de ADN por PCR.	54
2.10	Electroforesis de ADN.....	55
2.10.1	Electroforesis en geles de agarosa.....	55
2.10.2	Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	55
2.11	Hibridación de ADN.....	56
2.11.1	Transferencia de ADN desde geles de agarosa: Southern blot.	56
2.11.2	Prehibridación, hibridación y marcaje del ADN transferido.....	56
2.12	Secuenciación de ADN.....	56
2.13	Aislamiento y purificación de ARN.....	56
2.14	Ensayos de RT-PCR.	57
2.15	Soporte informático.	58
2.16	Análisis por HPLC.....	58
2.17	Purificación de tetraenos.....	59
2.18	Análisis por espectroscopía de masas.	59
2.19	Análisis de RMN de los compuestos polienos.....	59
2.20	Electroforesis de proteínas.....	59
2.21	Purificación de proteína His-Tag.	60
2.22	Ensayos <i>in vitro</i> de actividad enzimática.....	60

2.23	Ensayos de actividad biológica.....	61
2.23.1	Antibiogramas.....	61
2.23.2	Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias.....	61
2.24	Ensayos de toxicidad hemolítica.....	61
3	RESULTADOS.....	63
3.1	Análisis de la diversidad biosintética de macrólidos polienos en <i>S. diastaticus</i> var. 108.....	64
3.1.1	Determinación de especificidad de la unidad iniciadora por módulo de carga heterólogo.....	64
3.1.1.1	Obtención de un lisógeno de <i>S. diastaticus</i> var. 108 no productor de polienos: Interrupción del gen <i>rimA</i>	64
3.1.1.2	Modificación del módulo de carga.....	66
3.1.1.2.1	Expresión en condiciones heteróloga del módulo de carga <i>pimS0</i> en <i>S. diastaticus</i> var. 108.....	66
3.1.1.2.2	Obtención de Módulos de carga híbridos: <i>RimA-NysA</i>	68
3.1.2	Aumento cuantitativo en la heterogeneidad de producción en <i>S. diastaticus</i> var. 108.....	73
3.1.2.1	Interrupción en <i>rimJ</i>	73
3.1.2.2	Actividad amidotransferasa en la cepa <i>S. diastaticus</i> var. 108::PM1/709B.....	75
3.2	Análisis y caracterización de los tetraenos CE-108D, CE-108E, Rimocidina D y Rimocidina E.....	77
3.2.1	Purificación de los compuestos minoritarios a partir de <i>S. diastaticus</i> var. 108::PM1/709B-pSM858.....	77
3.2.2	Determinación de estructuras químicas.....	78
3.2.2.1	Análisis por HPLC-MS.....	78
3.2.2.2	Estructuras químicas de los compuestos CE-108D y CE-108E.....	78
3.2.2.3	Estructuras químicas de los compuestos Rimocidina D y Rimocidina E.....	79
3.2.3	Análisis de actividad antifúngica.....	81
3.2.3.1	Antibiogramas.....	81
3.2.3.2	Determinación de la CMI ₁₀₀	81
3.2.4	Análisis de la actividad hemolítica.....	83
3.2.5	Correlación entre los resultados de actividad antifúngica y toxicidad.....	84
3.3	Actividad de adorno post-PKS: análisis de la amidación.....	86
3.3.1	Análisis de la especificidad de sustratos.....	86
3.3.1.1	Híbridos PcsA y PcsB.....	87

3.3.2	Amidación por estrés.	92
3.3.2.1	Análisis del estrés térmico en <i>S. diastaticus</i> var. 108.	94
3.3.2.2	Obtención por estrés térmico de un mutante de <i>S. diastaticus</i> var. 108 productor de compuestos amidados.	96
3.3.3	Análisis comparativo de la producción de tetraenos en <i>S. diastaticus</i> var. 108 y <i>S. diastaticus</i> var. 108-3730.	98
3.3.3.1	Análisis de la producción temporal de tetraenos en <i>S. diastaticus</i> var. 108 y <i>S. diastaticus</i> var. 108-3730.	98
3.3.3.2	Análisis transcripcional de los genes <i>rimA</i> y <i>pcsA</i> mediante RT-PCR.	99
4	DISCUSIÓN	104
5	CONCLUSIONES	117
6	BIBLIOGRAFÍA	120
7	ANEXOS	131

1.INTRODUCCIÓN

1.1 *Streptomyces*.

1.1.1 Características generales.

El género *Streptomyces* pertenece a la familia Streptomycetaceae, dentro del orden Actinomicetales, en él se engloban un conjunto de bacterias filamentosas, miceliares, Gram-positivas, aerobias, con un alto contenido en guaninas y citosinas (G+C) en su genoma, llegando a alcanzar el 74% (Woese 1987). Esta característica los diferencia de otras bacterias Gram-positivas donde el porcentaje de G+C es inferior al 50% como son los casos de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus*. Se trata de microorganismos con una amplia distribución en la naturaleza, y pese a que su hábitat principal es el suelo, se han encontrado representantes del género *Streptomyces* en diversos ambientes marinos (Zhong, Caspi et al. 2002)

Hasta finales de los años 50 fueron considerados como un género intermedio entre bacterias y hongos al presentar características propias tanto de hongos, como el pleomorfismo y la capacidad de producir micelio, como de organismos procariota, tales como la carencia de núcleo, mitocondrias y cloroplastos.

Desde un punto de vista antropocéntrico la importancia de estos organismos deriva de su capacidad para producir una gran variedad de metabolitos secundarios con actividad biológica, muchos de los cuales son ampliamente aprovechados en la industria alimentaria y farmacéutica. Es resaltable el hecho que hasta el año 2002 se habían estimado en 8.700 los antibióticos aislados de actinomicetos frente a los 2.900 procedentes del resto de bacterias y los 4.900 de hongos (Berdy 2005), presentándose así como los principales productores de sustancias con actividad biológica.

También son productores de un gran cantidad de enzimas extracelulares, como proteasas (Henderson, Krygsman et al. 1987), celulasas, nucleasas, amilasas, lipasas, etc. de amplio interés en la industria.

1.1.2 Ciclo de vida.

Los Streptomicetos presentan un ciclo de vida complejo donde se ven implicados diversos procesos de diferenciación morfológica y fisiológica. El ciclo comienza con la germinación de una espora que va a dar lugar a un micelio vegetativo constituido por una

serie de hifas tabicadas. Esta compleja red de filamentos penetra en el medio con el objeto de obtener nutrientes a partir de la degradación del material orgánico gracias a numerosas enzimas extracelulares (Chater 2006). Esta motilidad de los filamentos vegetativos le confiere a *Streptomyces* una gran ventaja frente a otros microorganismos ante la colonización de sustratos en el suelo. En esta primera fase, las zonas más alejadas de la fuente de nutrientes empiezan a acumular sustancias de reserva (lípidos, glucógeno, etc.) posteriormente, y debido a la carencia de nutrientes, se dispara la expresión de genes implicados en la formación del micelio aéreo. La formación de micelio aéreo se apoya en la degradación del micelio sustrato aportando así los nutrientes necesarios para la formación de las hifas emergente. En una segunda etapa las hifas van a sufrir un proceso de curvatura, enrollamiento y formación de septos, acompañado de un engrosamiento de la pared celular para dar lugar a una cadena de esporas unicelulares. La diseminación de estas esporas en un medio favorable permitirá la germinación de la misma dando lugar a un nuevo micelio sustrato concluyendo así el ciclo de vida de *Streptomyces* (Figura 1.1)

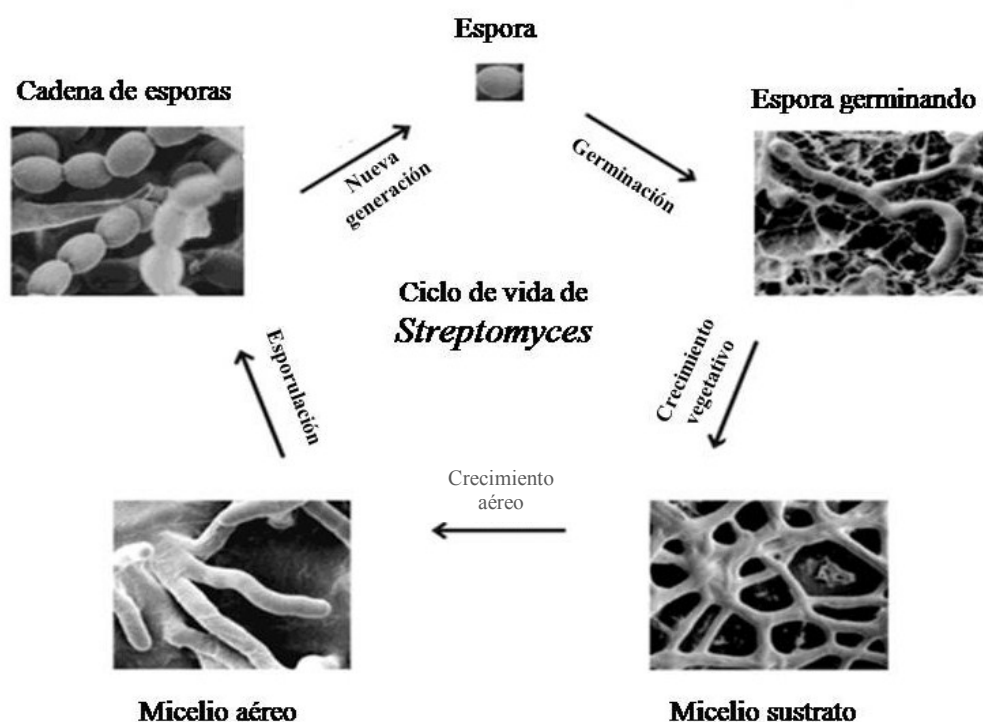


Figura 1.1: Ciclo de vida de *Streptomyces*.

1.1.3 Organización genómica.

El genoma de *Streptomyces* ha sido analizado en profundidad en la especie *Streptomyces coelicolor*, y aunque al principio hubo discrepancias entre la linealidad o circularidad del cromosoma, la confirmación de la linealidad del mismo llegó mediante estudios de electroforesis de campo pulsante (Leblond, Redenbach et al. 1993). Posteriormente se confirmaron la linealidad del cromosoma en otras especies del género como *Streptomyces griseus* (Lezhava, Mizukami et al. 1995) y *Streptomyces ambofaciens* (Leblond, Fischer et al. 1996).

En la actualidad se encuentran secuenciados y anotados en su totalidad los genomas de *S. coelicolor* A3 (2) (Bentley, Chater et al. 2002), constituido por un cromosoma lineal con 8.667.507 pb y el de *Streptomyces avermitilis* (Omura, Ikeda et al. 2001; Ikeda, Ishikawa et al. 2003) algo mayor con 9.025.608 pb, en tanto que otros están en proceso de anotación. Los estudios de secuenciación han aportado un gran avance en el conocimiento de la organización génica de *Streptomyces*.

Se ha observado una distribución génica diferenciada en función a la esencialidad de los genes, de tal manera que, aquellos genes que están relacionados con la replicación del ADN, la transcripción, la traducción y el metabolismo central se encuentra ubicados en la zona del cromosoma denominada *core*, mientras que los genes codificantes para funciones tales como la síntesis de metabolitos secundarios o enzimas hidrolíticas, se localizan en los brazos del cromosoma. Se considera que con esta distribución de los genes se evita la pérdida de información esencial a consecuencia de posibles delecciones en los extremos de los brazos del cromosoma (Hopwood, 2007).

Al igual que ocurre con otros procariotas, se ha observado una tendencia de agrupación de aquellos genes que están implicados en una misma ruta o proceso, denominándose a este agrupamiento *cluster*, un ejemplo de estos agrupamientos serían los *cluster* biosintéticos de antibióticos (Malpartida and Hopwood 1984).

La replicación cromosómica en *Streptomyces* se inicia bidireccionalmente desde un origen de replicación denominado *oriC* el cual se encuentra localizado en el centro del cromosoma (Zakrzewska-Czerwinska, Jakimowicz et al. 2000), para la finalización del proceso de replicación son requeridas una serie de proteínas terminales con unión a los extremos 5' del cromosoma.

La inestabilidad genética es un fenómeno muy común dentro del género *Streptomyces* (Volff and Altenbuchner 2000; Wenner, Roth et al. 2003), sin embargo solo ciertos genes, los cuales pueden variar de unas especies a otras, se ven afectados por esta inestabilidad. Las características que suelen verse afectadas incluyen la producción de antibióticos y resistencia a los mismos, así como a la esporulación, pigmentación y morfología de la colonia (Petkovic, Cullum et al. 2006). Ocasionalmente también se ven afectados genes del metabolismo primario. Parece ser que esta inestabilidad está relacionada con la presencia de repeticiones en los extremos del cromosoma, que pueden inducir deleciones de hasta 2Mb, estas deleciones pueden llevar a la pérdida de los telómeros y la consecuente circularización del cromosoma (Volff and Altenbuchner 1998). Sin embargo, algunos mutantes no muestran una reorganización genómica detectable, como ocurre en algunos de los casos descritos en *Streptomyces* como *S. rimosus* (Gravius, Bezmalinovic et al. 1993), *S. ambofaciens* o *S. lividans* (Volff and Altenbuchner 1997; Volff, Viell et al. 1997).

Existe un elevado número de elementos extracromosomales en el genoma de *Streptomyces*, principalmente plásmidos circulares de tamaño y número de copias muy variable (Hopwood 1986), plásmidos lineales con proteínas asociadas en los extremos (Kinashi and Shimaji 1987) y fagos con ADN de doble cadena (Hopwood 1985). El estudio de estos elementos y su utilización como herramientas genéticas ha permitido el desarrollo de la biología molecular del género *Streptomyces*.

1.2 Metabolitos secundarios.

1.2.1 Generalidades.

Bajo el término de metabolito secundario se engloba a una serie de compuestos que sin ser esenciales para los procesos de crecimiento y reproducción del organismo que los sintetiza, si son de relevante importancia para la supervivencia o interacción de éste con el medio en el que se desarrolla.

Estos compuestos son sintetizados al final de la fase de crecimiento exponencial y a lo largo de la fase estacionaria, la producción de estos compuestos requiere rutas biosintéticas largas y complejas, donde los sustratos suelen ser intermediarios del metabolismo primario ó modificaciones de estos. Los metabolitos secundarios presentan otras características tales como la especificidad de la cepa productora o la gran diversidad en cuanto estructura química y función (Vining 1992).

La agrupación, dentro del cromosoma, de los genes responsables de la síntesis de un determinado metabolito secundario, es un claro ejemplo de lo que denominamos *cluster* de biosíntesis (Martin and Liras 1989), este hecho ha facilitado el estudio de las rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios. La expresión de estos genes está controlada por una serie de reguladores que pueden actuar a distintos niveles.

La capacidad del género *Streptomyces* de producir una gran diversidad de metabolitos secundarios parece ser la consecuencia de un proceso evolutivo de adaptación a un medio de vida dinámico como es el suelo.

Gracias a esta capacidad de *Streptomyces* disponemos de una amplia gama de sustancias naturales con actividades biológicas muy diversas, y de gran utilidad en el ámbito de la alimentación, agricultura-ganadería y farmacia. Si bien la actividad biológica más conocida de las aportadas por este género a través de su metabolismo secundario es la antibiótica, existen otras muchas actividades de interés, tales como la antivírica, antitumoral, actividad frente a patogenicidad de priones (Hartsel and Bolard 1996; Lemke, Kiderlen et al. 2005), inmunosupresora, hipocolesterolemica o herbicida entre otras.

1.2.2 Metabolitos secundarios con actividad antibiótica.

En general se denomina antibiótico a aquellos compuestos que interactúan con los procesos biológicos de un organismo, donde el resultado de dicha interacción es el control de la proliferación celular (biostáticos) o la muerte celular (biocidas).

Los antibióticos son, en su mayor parte, productos procedentes del metabolismo secundario de microorganismos procariotas (Actinomicetos, *Bacillus*, etc.) o eucariotas (hongos), siendo la mayor parte de ellos producidos por el género *Streptomyces*. Algunos de los antibióticos más representativos se presentan en la Tabla 1.1.

Antibiótico	Organismo productor	Referencia
Actinorrodina	<i>S. coelicolor</i>	(Malpartida and Hopwood 1984)
Anfotericina B	<i>S. nodosus</i>	(Oura, Sternberg et al. 1955)
Cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	(Vats, Stuttard et al. 1987)
Eritromicina	<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	(Weber, Wierman et al. 1985)
Estreptomicina	<i>S. griseus</i>	(Jones, Metzger et al. 1944)
Kanamicina	<i>S. kanamyceticus</i>	(Yanai and Murakami 2004)
Neomicina	<i>S. fradiae</i>	(Huang, Haydock et al. 2005)
Oxitetraciclina	<i>S. rimosus</i>	(Binnie, Warren et al. 1989)
Rapamicina	<i>S. higroscopicus</i>	(Schwecke, Aparicio et al. 1995)
Tiostreptona	<i>S. azureus</i>	(Cundliffe 1978)

Tabla 1.1: Ejemplos de antibióticos producidos por el género *Streptomyces*.

La clasificación de los antibióticos puede realizarse atendiendo a diferentes parámetros, en relación a su estructura química podemos distinguir los siguientes grupos:

- **Peptídicos:** Son compuestos formados por cadenas de aminoácidos sintetizadas en su mayoría mediante péptido sintetasas, independiente de la vía ribosomal, que van a sufrir una serie de modificaciones postraduccionales y procesamientos proteolíticos para dar lugar a estructuras muy variadas. Destaca entre ellos el tripéptido L- α -aminodipol-L-cisteinil-D-valina (ACV) que es la molécula precursora de los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, etc.).
- **Aminoglucósidos:** Se trata de derivados de aminoazúcares a un aminociclitol, a este grupo pertenecen los antibióticos Neomicina, Vancomicina, Kanamicina, Estreptomicina, Gentamicina, Higromicina, etc.
- **Poliquétidos:** Este grupo engloba a un conjunto de compuestos con estructuras químicas muy variadas, cuya biosíntesis deriva de sucesivas condensaciones de metabolitos elementales, las cuales son llevadas a cabo por una actividad enzimática denominada poliquétido sintasa (PKS). Entre

estos compuestos se incluyen Eritromicina, Actinorrodina, Anfotericina B, etc.

- **Nucleósidos:** Son análogos estructurales de los nucleósidos, por lo que pueden sustituir a estos en la biosíntesis de ácidos nucleicos o bloquear su síntesis. Este grupo antibióticos son producidos por actinomicetos y hongos, entre todos ellos cabe destacar Puromicina.
- **Otros:** En este grupo se incluyen todos aquellos antibióticos que debido a su naturaleza química no pueden ser incluidos en ninguno de los grupos anteriores; Cloranfenicol y Fosfomicina, suponen dos claros ejemplos de esta situación.

1.3 Poliquétidos.

Los antibióticos poliquétidos son compuestos producidos por una gran variedad de organismos, los actinomicetos en general, y el género *Streptomyces* en particular son considerados sus principales productores.

Como se expuso en el apartado anterior, dentro el grupo de los compuestos poliquétido encontramos una gran diversidad estructural teniendo como punto de cohesión entre ellos un mecanismo biosintético común, el cual deriva de la acción de un complejo de actividades enzimáticas denominada poliquétido sintasa (PKS). El nombre genérico de poliquétido viene dado por la presencia de numerosos grupos cetos en la cadena policarbonada originada por la acción de las PKSs.

1.3.1 Síntesis de poliquétidos: mecanismo biosintético de las PKSs.

El mecanismo biosintético de las PKSs está estrechamente relacionado con el de las sintasas de ácidos grasos de cadena larga (FAS), en ambos complejos enzimáticos intervienen las actividades: aciltransferasa (AT), β -cetoacil sintasa (KS), proteína transportadora de grupos acilo (ACP), β -ceto-reductasa (KR), deshidratasa (DH) y enoilreductasa (ER) (Hopwood and Sherman 1990).

Las PKSs dan lugar a cadenas policetónicas mediante sucesivas condensaciones, cada una de las cuales contribuyen con dos o más átomos de carbono al esqueleto de la cadena policarbonada en lo que llamamos un ciclo de elongación. El mecanismo básico de un ciclo de elongación comienza con la transferencia de la cadena hidrocarbonada por

elongar, desde el dominio ACP del módulo anterior, al residuo cisteína del centro catalítico del dominio KS del módulo responsable del paso de elongación en proceso. La unidad elongadora o iniciadora de la cadena policetónica, un ester de ácidos carboxílico en su forma activa (tioester CoA), es seleccionada del medio por el dominio AT para ser transferida al grupo tiol del brazo de 4' fosfopantoteína del dominio ACP. Finalmente el dominio KS cataliza la condensación de Claisen entre la cadena en formación y la unidad elongadora con la consecuente pérdida de CO_2 . El enlace simple (C-C) derivado de esta condensación puede sufrir distinto grado de reducción en función de la presencia de los dominios KR, DH y ER, de tal forma que, un dominio KR daría lugar a un grupo hidroxilo, por β -cetoreducción, la acción combinada de este junto con un dominio DH origina un grupo enoilo, por deshidratación del grupo hidroxilo y la acción conjunta de los tres dominios, KR, DH y ER, generarían un grupo metileno mediante la enoil-reducción del grupo enoilo. La ausencia de estos dominios funcionales mantendría la presencia de un enlace simple en ese punto de la cadena (Figura 1.2).

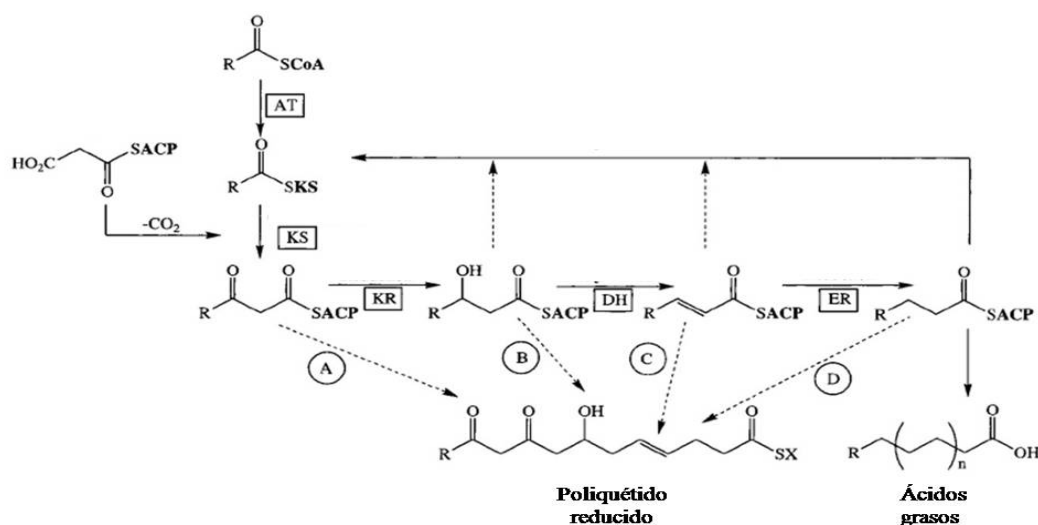


Figura 1.2: Ruta básica de biosíntesis de ácidos grasos y poliquétidos. Los diferentes grados de reducción que puede sufrir la cadena policetónica para dar lugar a grupos ceto, hidroxilo, enoilo o metileno, están representados con las letras A, B, C y D respectivamente. Las unidades iniciadoras y elongadoras son siempre acetil-CoA y malonil-CoA en la síntesis de ácidos grasos, para los poliquétidos las unidades iniciadoras son muy diversas desde ácidos carboxílicos lineales a anillos aromáticos, alifáticos, etc., y como unidad elongadora puede utilizar malonil-CoA, metilmalonil-CoA o etilmalonil-CoA, en los dos últimos casos estas incorporaciones dan lugar a la aparición de cadenas laterales metilo y etilo respectivamente. (Adaptado de Hopwood, 1997).

A pesar de la similitud entre los procesos enzimáticos de las FASs y las PKSs habría que mencionar algunas diferencias entre ellos que incrementan la diversidad estructural de los compuestos poliquétidos resultantes (Katz and Donadio 1993):

- 1) Las FASs solo utilizan como unidad iniciadora acetato en su forma activa acetil-CoA, mientras que las PKSs pueden utilizar para el inicio de la biosíntesis del poliquétido otros tioésteres de ácidos carboxílicos lineales (metil-CoA, propionil-CoA, butiril-CoA...) o ramificados, anillos aromáticos, etc. Igualmente las FASs utilizan únicamente malonil-CoA como unidad elongadora, mientras que las PKSs pueden incorporar no solo malonil-CoA sino también metilmalonil-CoA y etilmalonil-CoA dando lugar a la aparición de cadenas laterales metilo y etilo respectivamente.
- 2) Las FASs siempre completan la reducción de sus grupos ceto hasta metileno, sin embargo, las PKSs pueden no concluir este proceso dando lugar a los distintos grupos: ceto, hidroxilo, enoilo o enlace simple C-C.
- 3) La síntesis de poliquétidos da lugar a la formación de esteroisómeros mediante la formación de centros quirales.
- 4) Una vez sintetizada la cadena policetónica, ésta puede sufrir un proceso de plegamiento y ciclación, que da lugar a la formación de anillos aromáticos (poliquétidos aromáticos) ó macrocíclicos (poliquétidos macrólidos). También pueden ser objeto de las llamadas modificaciones de “adorno” tales como glicosilaciones, metilaciones, etc.

1.3.1.1 Tipos de PKSs.

Una primera clasificación de las PKSs fue realizada en base a la analogía de estas con las FASs (Hutchinson and Fujii 1995), de modo que, al igual que nos encontramos FAS Tipo I, características de hongo y vertebrados; y FAS Tipo II propias de bacterias y plantas, (Hopwood and Sherman 1990), nos encontramos PKS Tipo I y Tipo II. Con posterioridad se ha introducido un nuevo grupo denominado PKS Tipo III.

- **PKS Tipo I:** Consta de varias proteínas multifuncionales cada una de las cuales presentan diferentes dominios catalíticos distribuidos en el orden preciso en el que van a ser utilizados en la biosíntesis de la cadena policetónica. Estas PKSs presentan una gran complejidad a nivel genético, pudiendo ocupar sus genes codificantes varias decenas de miles de nucleótidos del genoma. Este tipo se puede subdividir a su vez en dos subtipos:

- **Modulares:** En este caso las PKSs se encuentran organizadas en módulos, donde cada módulo presenta un dominio KS, un dominio AT y un dominio ACP, dependiendo del módulo pueden estar presentes o no los dominios KR, DH y ER. Generalmente, cada módulo es responsable únicamente de un ciclo de elongación por lo que el número de módulos se correlaciona con el número de ciclos de elongación que realiza la PKS. Esta relación entre la estructura de la PKS y la estructura del metabolito que produce, se denomina principio de colinealidad, el cual permite la determinación de la estructura química de la cadena policétida a partir de la arquitectura de la PKS y viceversa. Este principio puede ser aprovechado para la obtención de poliquétidos complejos mediante la manipulación genética de las PKSs responsables de la síntesis de poliquétidos (Cane, Walsh et al. 1998). Un ejemplo de este tipo de PKS es la 6-deoxieritronólido sintasa (DEBS) (Weber, Leung et al. 1990; Rawlings 2001).
- **Iterativa:** En este tipo de PKS los dominios KR, DH y ER pueden ser utilizados opcionalmente en cada ronda de elongación.
- **PKS Tipo II:** Se trata de complejos multienzimáticos donde cada dominio catalítico se encuentra localizado en una proteína diferente que van a actuar de manera reiterativa. Aunque no siempre se codifican de una manera consecutiva en el genoma, se cree que forman complejos in vivo parecidos a los de las PKSs Tipo I (Austin and Noel 2003). La PKS Tipo II mínima está compuesta por un complejo multienzimático de tres polipéptidos denominados KS α , KS β , y ACP. El dominio KS α contiene los centros activos para las actividades KS y AT (Fernandez-Moreno, Martinez et al. 1992). La proteína KS β intervendría en la determinación de la longitud de la cadena policetónica, por lo que se le dio el nombre de factor de elongación de cadena o CLF (Khosla, McDaniel et al. 1993; McDaniel, Ebert-Khosla et al. 1993). Además de la PKS mínima pueden aparecer otras actividades enzimáticas como aromatasas (ARO) o cetoreductasas (KR) entre otras.
- **PKS Tipo III:** Llevan a cabo un complejo de reacciones tales como, elección de la unidad iniciadora, condensación descarboxilativa de las unidades de elongación, ciclación del anillo y aromatización de la cadena policetónica, en un sitio activo multifuncional, cuya actividad enzimática se repite de forma reiterativa

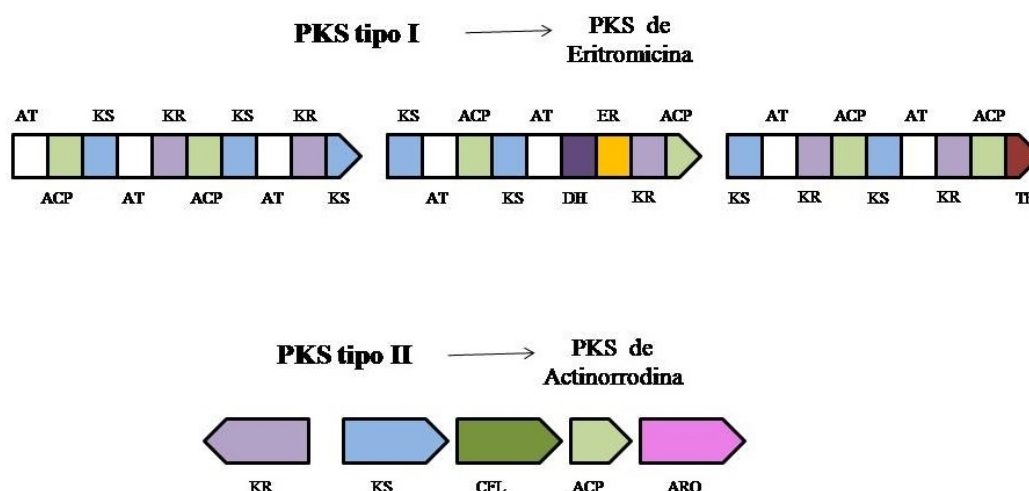


Figura 1.3: Esquema de organización de las PKSs Tipo I y Tipo II.

1.3.2 Clasificación de poliquétidos.

Debido a la capacidad de las PKSs de; tomar como unidad iniciadora distintos tipos de moléculas, tales como malonil-CoA, metilmalonil-CoA o etilmalonil-CoA como unidades elongadoras, así como la variabilidad que pueden presentar en cuanto al número de ciclos de elongación que dan lugar a distintos tamaños del esqueleto hidrocarbonado, nos encontramos con un grupo de antibióticos de una gran diversidad química. Esta diversidad puede a su vez verse incrementada a través de las diferentes modificaciones denominadas “de adorno “o post-PKS, una vez que se ha producido la ciclación de la cadena policetónica. Este mecanismo sintético proporciona una gran variedad de estructuras de una gran complejidad química en base a la cual, podemos clasificar a los poliquétidos en tres grupos: poliquétidos aromáticos, poliquétidos macrólidos y poliquétidos poliéteres.

- **Poliquétidos aromáticos:** Su principal característica es la presencia de un anillo aromático en su estructura química. En este grupo se encuentran principalmente compuestos sintetizados por PKSs Tipo II aunque también se pueden encontrar procedentes de PKSs Tipo I iterativas. El primer poliquétido aromático cuyos genes biosintéticos fueron estudiados fue Actinorrodina, producida por *S. coelicolor* A3(2) (Hopwood and Wright 1976) (Malpartida and Hopwood 1984). La unidad iniciadora de los polienos aromáticos suele ser acetil-CoA, aunque existen excepciones como es el caso de la Oxitetraciclina cuya unidad iniciadora es malonamida.

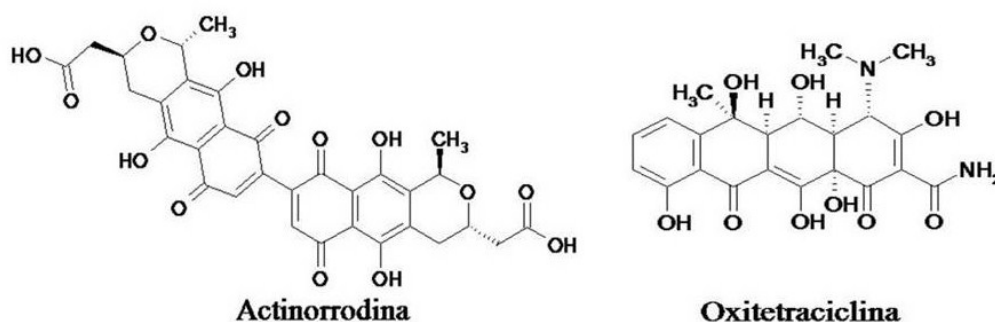


Figura 1.4: Estructura química de algunos poliquétidos aromáticos.

- Poliquétidos macrólidos:** Se caracteriza por la presencia de un anillo macrocíclico cerrado por la esterificación intramolecular de un grupo hidroxilo y un grupo carboxílico de la cadena policetónica. Estos compuestos siempre son sintetizados por una PKSs Tipo I. Dentro de los poliquétidos macrólidos podemos distinguir dos grupos:
 - Macrólidos polienos:** Presentan varios dobles enlaces conjugados en el anillo macrocíclico.
 - Macrólidos no polienos.** Se caracterizan por la presencia de grupos metilo e hidroxilo exocíclicos en varias posiciones del anillo macrocíclico y al menos un residuo glucosídico, que parece ser el responsable de la actividad antibiótica. Los macrólidos no polienos presentan un número variable de átomos de carbono que oscila entre 12-18, aunque existe excepciones como es el caso de las axenomicinas que poseen 34 átomos de carbono.

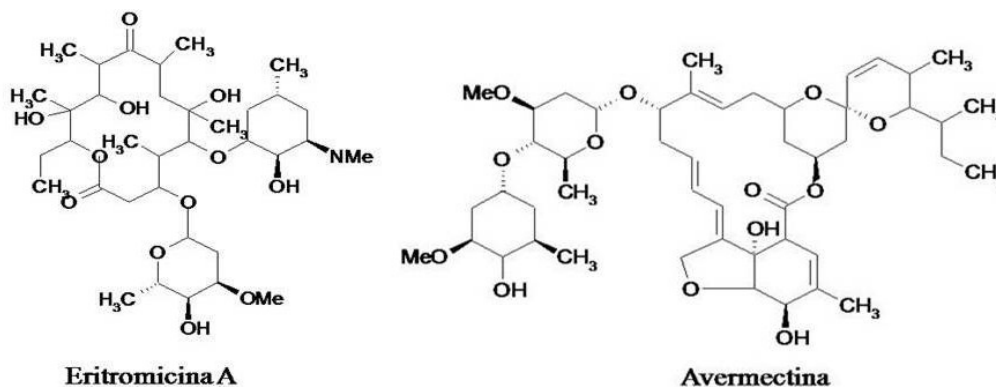


Figura 1.5: Estructura química de algunos macrólidos no polienos.

- **Poliquétidos poliéteres:** Se caracterizan por la presencia de varios grupos éter formados por la interacción de dos grupos hidroxilos de la cadena policetónica. Estos compuestos son sintetizados por PKSs Tipo I mediante sucesivas condensaciones de unidades metilmalonil-CoA y etilmalonil-CoA. Monensina A y Monensina B suponen dos claros ejemplos de antibióticos poliquétidos poliéteres (Figura 1.6).

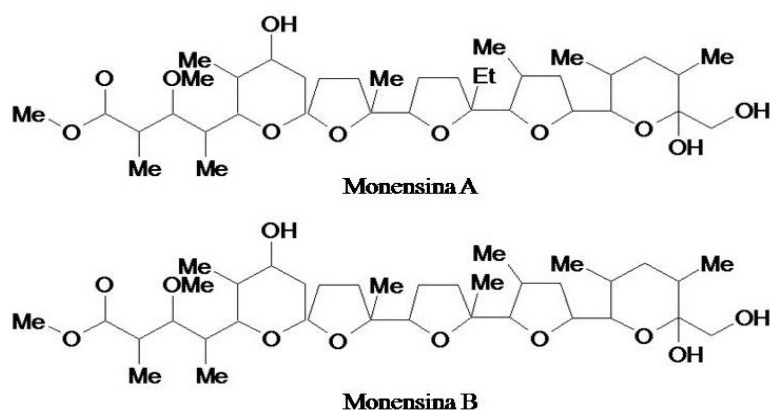


Figura 1.6: Estructura química de algunos poliquétidos poliéteres.

1.4 Macrólidos polienos.

Los macrólidos polienos son antibióticos con actividad antifúngica producidos principalmente por el género *Streptomyces*.

Como todos los poliquétidos macrólidos, los polienos son el resultado de la acción biosintéticas de una PKSs Tipo I que origina una cadena policetónica, con una serie de dobles enlaces conjugados debido a la acción conjunta de los dominios KR y DH, en 3 o más módulos consecutivos. La molécula lineal sufre un proceso de lactonización que origina el anillo macrocíclico característico.

Posteriormente estas macrolactonas pueden ser objeto de varias reacciones químicas que aporten diferencias estructurales (modificaciones de adorno) a la molécula, obteniéndose así una mayor diversidad de compuestos.

1.4.1 Biosíntesis de los macrólidos polienos.

1.4.1.1 Organización génica y mecanismo enzimático de las PKSs Tipo I.

Las PKSs Tipo I presentan una actividad enzimática distribuida en varias proteínas multifuncionales en la que encontramos diferentes dominios catalíticos. A cada una de estas proteínas multifuncionales también se les denominan PKSs.

En las PKSs Tipo I los distintos dominios funcionales van a actuar en un único paso de la ruta biosintética, de tal modo que vamos a encontrar tantos dominios KS, AT y ACP como módulos de condensación sean necesarios para completar la biosíntesis de la cadena policetónica. Sin embargo, los dominios KR, DH y ER, por lo general solo estarán presentes en aquellos módulos que vayan a originar la reducción del grupo ceto procedente del módulo anterior, de tal forma que; una reducción hacia un grupo hidroxilo se produce por la presencia de un dominio KR, un grupo enoilo por la existencia de los dominios KR y DH, y un grupo metileno por la presencia conjunta de los tres dominios. Debido a esta organización modular, el grado de complejidad genética es mucho mayor en las PKSs Tipo I que en las PKSs Tipo II (Figura 1.7).

El polipéptido encargado de iniciar la síntesis de la cadena policetónica presenta en su extremo N-terminal el módulo encargado de tomar la unidad iniciadora de la biosíntesis, el cual es denominado módulo de arranque o de carga. Los módulos de carga presentan naturalezas muy diversas, por ejemplo, la PKS de Eritromicina (Pereda, Summers et al. 1998; Lau, Cane et al. 2000) presenta: un dominio AT seguido de un dominio ACP y en el caso de Rapamicina (Molnar, Aparicio et al. 1996) aparecen: un dominio ácido carboxílico-CoA ligasa (CoL) seguido de un dominio AT.

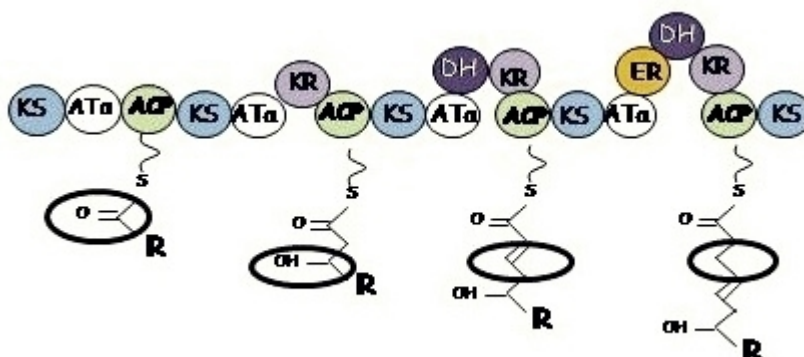


Figura 1.7: Reducción de la cadena policetónica en función a la presencia de los dominios β-ceto-reductasa (KR), dehidratasa (DH) y enoilreductasa (ER).

En el caso de los macrólidos polienos parece ser que los módulos de arranque se presentan aislados del resto de proteínas multifuncionales (Aparicio, Colina et al. 1999; Brautaset, Sekurova et al. 2000; Caffrey, Lynch et al. 2001; Seco, Perez-Zuniga et al. 2004) aunque se ha descrito para Candidicina que el módulo de arranque se encuentra asociado al primer módulo de elongación (Campelo and Gil 2002).

Se ha observado en los centros activos de los dominios KS de los módulos de arranque de Anfotericina (AmphA), Nistatina (NysA), Pimaricina (PimS0) y Rimocidina/CE-108 (RimA) la presencia de un residuo serina en la posición 170 (KS^S) en lugar del típico residuo cisteína. El sentido de esta sustitución aun no ha sido esclarecido, pero experimentos realizados en la KS^S de Nistatina hacen pensar que este residuo no tiene una importancia crítica para la actividad del módulo de arranque (Brautaset, Borgos et al. 2003).

En la Figura 1.8 vemos la existencia de dos diferentes tipos de PKS de arranque para los macrólidos polienos, de tal forma que las PKSs de carga de Anfotericina (AmphA) y Nistatina (NysA) presentan dominios KS^S-AT-DH-ACP, mientras que las de Pimaricina (PimS0), Candidicina (CanP1) y Rimocidina/CE-108 (RimA) los dominios son: CoL (ácido carboxílico CoA ligasa)-ACP-KS^S-AT-ACP.

La presencia de unos dominios u otros en las PKS de arranque no determina la elección de una u otra unidad iniciadora. Las unidades iniciadoras en la síntesis de macrólidos polienos, suelen ser los ésteres de ácidos carboxílicos lineales: acetil-CoA, propionil-CoA o butiril-CoA, aunque existen excepciones como el caso de Candidicina, la cual incorpora ácido p-aminibenzoico (PABA).

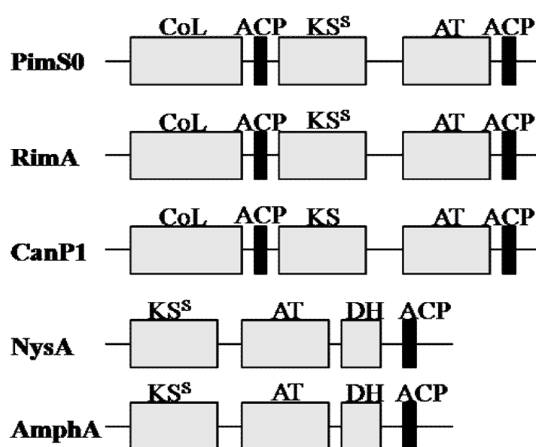


Figura 1.8: PKSs Tipo I implicadas en el inicio de la biosíntesis de Pimaricina (PimS0) (Aparicio, Colina et al. 1999; Mendes, Aparicio et al. 2000); Rimocidina/CE-108 (RimA) (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004); Candidicina (CanP1) (Campelo and Gil 2002); Nistatina (NysA) (Brautaset, Sekurova et al. 2000); y Anfotericina B (AmphA) (Caffrey, Lynch et al. 2001).

Los módulos de carga de Anfotericina (AmphA) (Caffrey, Lynch et al. 2001), Nistatina (NysA) (Brautaset, Sekurova et al. 2000) y Pimaricina (PimS0) (Aparicio, Colina et al. 1999; Mendes, Aparicio et al. 2000) parecen tomar como unidad iniciadora únicamente acetil-CoA, ya que todos los compuestos descritos hasta ahora en las correspondientes rutas, presentan una cadena lateral metilo en el carbono adyacente al enlace ester de la lactona. En el caso de Nistatina se ha descrito que su módulo de arranque puede iniciar la síntesis de la cadena policetónica mediante la descarboxilación de una molécula malonil-CoA, ó directamente utilizando acetil-CoA (Brautaset, Borgos et al. 2003).

Un caso particular en el reconocimiento relajado de la unidad iniciadora lo presenta la PKS de arranque de Rimocidina, RimA, la cual es capaz de reconocer como unidad iniciadora tanto acetil-CoA como butiril-CoA dando lugar indistintamente a los polienos CE-108 y Rimocidina respectivamente (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004).

El resto de proteínas multifuncionales o PKSs implicadas en el proceso de formación de la cadena policetónica, presentan un tamaño variable en función del número de módulos de elongación que posean. Los dominios AT de los módulos de elongación son capaces de tomar como unidad elongadora malonil-CoA, metilmalonil-CoA o etilmalonil-CoA, que tras la correspondiente condensación descarboxilativa con la cadena en formación, la cual es catalizada por el dominio KS, incorpora a ésta una molécula de acetato, propionato o butirato. En los casos en el número de carbonos incorporados a la cadena son tres (propionato) o cuatro (butirato) se forman cadenas laterales metilo y etilo respectivamente, ya que la condensación siempre se produce a nivel del carbono adyacente al grupo carboxilo.

Las PKSs de macrólidos polienos implicadas en el último módulo de elongación aparecen aisladas del resto de PKSs, constituyendo un péptido independiente, que presentan en su extremo C-terminal un dominio tiosterasa (TE). Este dominio TE es el encargado de hidrolizar el enlace entre la cadena policetónica ya formada y el grupo prostético 4'fosfopanteteína del último dominio ACP. En algunas ocasiones se puede encontrar otra proteína tiosterasa independiente, que podría estar implicada en la corrección de errores producidos durante la síntesis de la cadena.

En la Figura 1.9 está representada, como ejemplo de organización genética de una PKS I, la correspondiente a la PKS encargada de la biosíntesis de la cadena policetónica de Pimaricina. Esta PKS está organizada en 5 polipéptidos o PKSs denominados: PimS0,

PimS1, PimS2, PimS3 y PimS4. PimS0, es responsable de iniciar la biosíntesis de la cadena policetónica mediante un módulo de carga aislado, PimS1 y PimS2 son dos proteínas multimodulares, responsables de los cuatro primeros módulos de elongación y los módulos del 5 al 10 respectivamente, PimS3 presenta un único módulo elongación, el 11 y PimS4 presenta el último módulo de elongación que aporta el típico dominio tioesterasa.

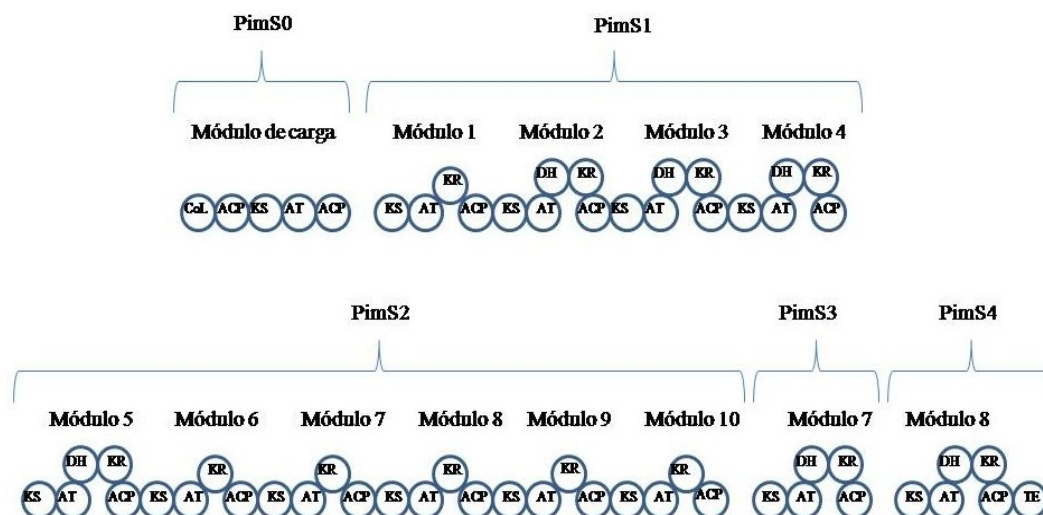


Figura 1.9: Organización genética de la PKS de Pimaricina.

Los genes que codifican para PKSs presentan un alto grado de conservación, lo cual ha permitido el reconocimiento de unas secuencias características para cada dominio funcional.

Los dominios KS mantienen la secuencia GPXXXXXTACSS alrededor del residuo de cisteína altamente conservado (Donadio, Staver et al. 1991; Bevitt, Cortes et al. 1992; Donadio and Katz 1992; Aparicio, Molnar et al. 1996), además son característicos dos residuos de histidinas en las posiciones 135 y 173 a partir del centro activo hacia el extremo C-terminal.

En los dominios AT existe un motivo muy conservado, GHSXG, alrededor del residuo activo de serina, además de los residuos glutamina, arginina e histidina en las posiciones 11, 117 y 190 respectivamente (Serre, Verbree et al. 1995; Aparicio, Molnar et al. 1996).

En los dominios funcionales ACP se encuentra bastante conservada la secuencia LGXDSLXXVE en torno al centro activo de serina (Scrutton, Berry et al. 1990).

Los dominios KR y ER presentan un mismo motivo conservado GXGXXGXXA (Aparicio, Molnar et al. 1996), a diferencia del dominio DH cuyo motivo característico es HXXXGXXXXP (Bevitt, Cortes et al. 1992; Donadio and Katz 1992).

1.4.1.2 Modificaciones de adorno.

La molécula resultante de la ciclación de la cadena policetónica puede ser objeto de una serie de modificaciones denominadas de adorno o post-PKS que contribuyen a la ampliación de la variedad molecular a partir de una misma estructura química. En la mayoría de los casos estos cambios estructurales son cruciales para la actividad biológica del polieno. Entre las modificaciones post-PKS más frecuentes caben citar las generadas por oxidoreductasas y transferasas.

Dentro de las oxidoreductasas se encuentran enzimas como oxigenasas, oxidasas, peroxidasa, reductasas (cetoreductasas) y deshidrogenasas, que van a dar lugar a grupos hidroxilos, carbonilo y epóxidos ó a transformaciones, de los grupos ceto en alcohol y aldehído en ácido carboxílico, mediante modificaciones por adición o eliminación de hidrógenos.

Se han descrito varios tipos de reacciones químicas catalizadas por oxigenasas como: hidroxilaciones (Shafiee and Hutchinson 1987) o epoxidaciones. (Mendes, Recio et al. 2001; Mendes, Anton et al. 2005) Las oxigenasas más comunes son las pertenecientes a la familia de los citocromo P-450 monooxigenasas, los cuales han sido descritos en muchos *cluster* de biosíntesis de poliquétidos macrólidos como son el de Eritromicina (Haydock, Dowson et al. 1991; Weber, Leung et al. 1991; Stassi, Donadio et al. 1993), Oleandomicina (Rodriguez, Olano et al. 1995), Nistatina (Brautaset, Sekurova et al. 2000), Pimaricina (Aparicio, Fouces et al. 2000), Anfotericina (Caffrey, Lynch et al. 2001), y Rimocidina (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004). En la secuencia de estas enzimas existen dos motivos muy conservados alrededor de un residuo treonina y otro alrededor de un residuo cisteína.

Las transferasas son enzimas que catalizan la transferencia de un grupo funcional aportando una nueva reactividad al polieno de partida. Existen varios subtipos de enzimas dentro de este grupo alguno de ellos son: metiltransferasas, acetiltransferasas,

glicosiltransferasas, aminotransferas, amidotransferasa, etc. Este grupo de enzimas requieren de cofactores que permitan al sistema la transferencia de los distintos grupos al polieno. En el caso de las metiltransferasas normalmente utilizan S-adenosilmetionina y en las aminotransferas se usan los aminoácidos (aa) alanina o ácido glutámico como amino donador.

Las glicosiltransferasas son responsables de la incorporación de deoxiaminoazúcares a la aglicona (ó macrolactona) de algunos macrólidos (Nedal and Zotchev 2004; Seco, Perez-Zuniga et al. 2004), estas enzimas utilizan como donador de azúcares la forma activada unida a uracildifosfato, guanidildifosfato o tiamindifosfato, siendo esta última la más frecuente. La introducción del azúcar a la aglicona suele tener un papel esencial en la actividad de muchos polienos (Mendez and Salas 2001).

En el presente trabajo toma una relevante importancia la modificación post-PKS consistente en la transformación el grupo carboxilo exocíclico en grupo amida, esta actividad de decoración fue detectada en extractos acelulares de *S. diastaticus* var.108 para la obtención de las carboxiamidas de Rimocidina y CE-108 (Rimocidina B y CE-108B) y de *Streptomyces. sp* RGU 5.3 para la obtención de AB-400, la carboxiamida de Pimaricina (Seco, Fotso et al. 2005). En el caso de *S. sp* RGU 5.3 la producción de AB-400 podía ser detectada directamente en los caldos de cultivo ya que en esta cepa se produce la amidación *in vivo* de Pimaricina en concentraciones significativas.

1.4.1.2.1 Amidotransferasas de polienos.

Recientemente han sido descritos los genes *pcsA* (Seco, Miranzo et al.) y *pcsB* (Miranzo, Seco et al.), como los primeros genes responsables de una actividad amidotransferasa en macrólidos polienos, capaces de transformar el carboxilo exocíclico en amida primaria.

Las proteínas para las cuales codifican estos genes, PcsA y PcsB, pertenecen al grupo de las amidotransferasas dependientes de glutamina Tipo II (Zalkin and Smith 1998), concretamente se trata de enzimas pertenecientes a la familia de las asparaginas sintasas del tipo AsnB dependiente de ATP. Se han encontrado otros genes del tipo *asnB* implicados en la biosíntesis de algunos antibióticos como en los casos de oxitetraciclina (Zhang, Ames et al. 2006), phenacinas (Chin, Thomas-Oates et al. 2001), Tioestreptona (Kelly, Pan et al. 2009), etc.

Las enzimas PcsA y PcsB presentan la estructura típica de la familia asparagina sintasa, con la presencia de dos dominios: un dominio glutaminasa y un dominio sintasa. En el dominio glutaminasa se produce la hidrólisis de la glutamina, cebándose así el sistema de los grupos amidas que van a ser transferidos a los polienos. Este dominio presenta el residuo Cys-1 altamente conservado y localizado en el extremo amino-terminal, seña característica de las amidotransferasas dependientes de glutamina Tipo II. Ambos dominios están conectados por un “túnel funcional”, a través del cual es dirigido el radical amino, procedente de la hidrólisis del grupo amido de la glutamina, hacia para el dominio sintasa para generar el grupo amida. Por lo tanto, en el dominio sintasa localizado en el extremo carboxilo-terminal de la proteína, tiene lugar la transferencia del grupo amida, procedente de la glutamina, al carboxilo del sustrato (Huang, Holden et al. 2001; Li, Beeson et al. 2007).

Se ha determinado mediante reacciones *in vitro* que tanto PcsA como PcsB reconocen como sustrato los polienos sintetizados por sus cepas de procedencia, es decir, PcsA reconoce a los tetraenos carboxilados producidos por *Streptomyces diastaticus* var. 108 (Rimocidina y CE-108), y PcsB reconoce al tetraeno Pimaricina, sintetizado por *Streptomyces sp.* RGU5.3, entre otras especies. Sin embargo, solo ha sido observado un reconocimiento heterólogo por parte de PcsA hacia Pimaricina (Figura 1.10). Podríamos hablar entonces, de una diferencia de especificidad de sustratos entre ambas enzimas pese a presentar una similitud del 93,5% e identidad del 87,2%. (Miranzo, Seco et al. 2010 ; Seco, Miranzo et al. 2010).

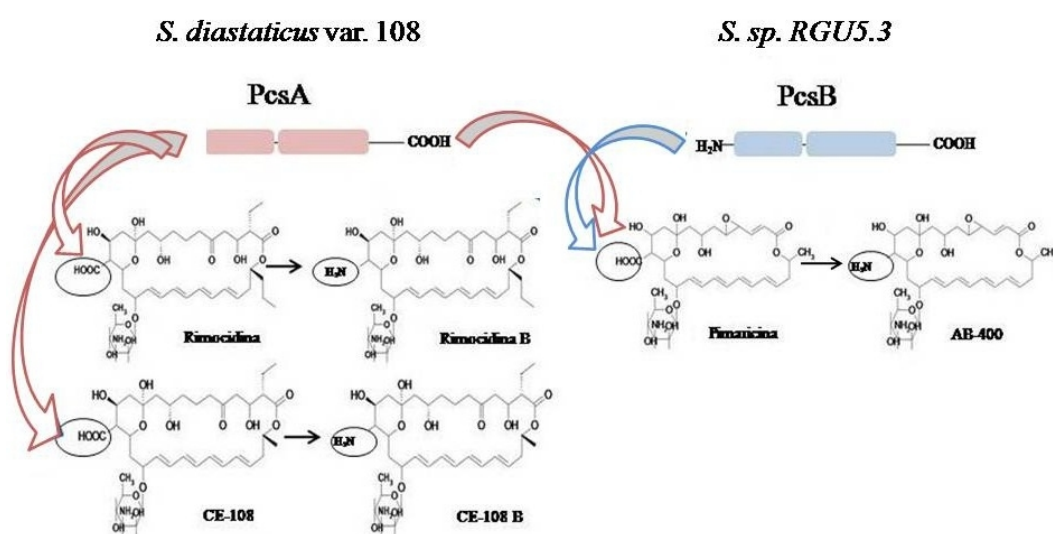


Figura 1.10: Especificidad de sustrato por parte de las amidotransferasas PcsA y PcsB, indicando las cepas de procedencia tanto de las enzimas como sus sustratos.

1.4.2 Estructura química de los macrólidos polienos.

La característica principal de este grupo de compuestos a nivel de estructura química, es la presencia de varios dobles enlaces conjugados en el anillo macrocíclico, una macrolactona con un número variable de carbonos que oscila entre 20 y 44. El número de dobles enlaces conjugados proporciona a la molécula un espectro ultravioleta característico, además, este número variable de dobles enlaces permite utilizar una clasificación sencilla, de tal forma que hablamos de trienos, tetraenos, pentaenos, hexaenos y heptaenos para polienos con 3, 4, 5, 6 y 7 dobles conjugados enlaces respectivamente. Se han descrito también polienos con dobles enlaces conjugados con un grupo ceto, formando el subgrupo conocido como oxo-polienos, entre los que se encuentra la Flavofungina.

Los macrólidos polienos son moléculas con carácter anfipático, derivado de la presencia de los dobles enlaces conjugados, que dotan a la molécula de una región lipofílica plana, constituida por el anillo de la macrolactona, y una región hidrofílica flexible, correspondiente a los grupos polares exocíclicos. El cromóforo, constituido por los dobles enlaces, es además responsable de características físicas y propiedades químicas tales como: la fuerte absorción de la luz, fotolabilidad y la baja solubilidad en agua.

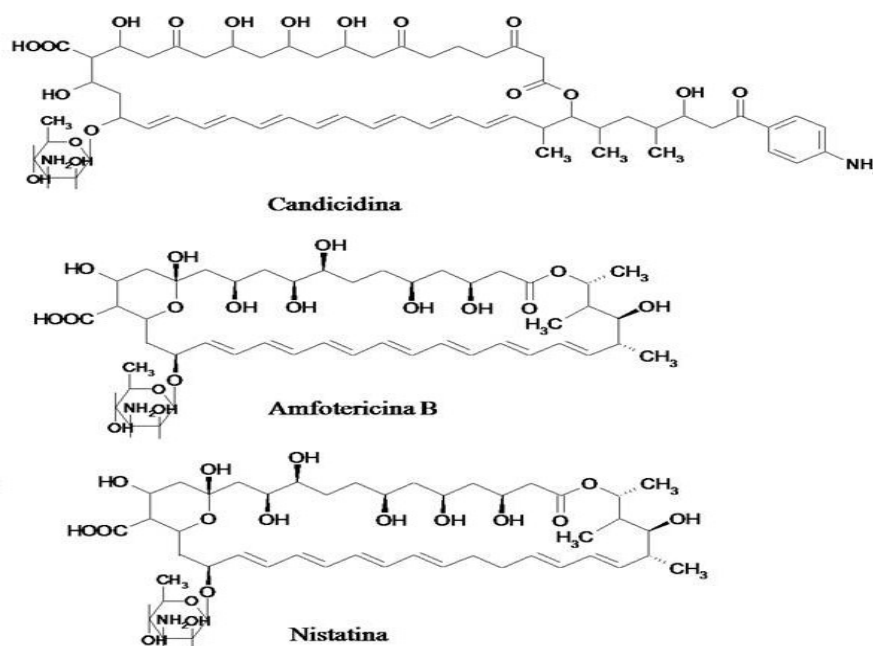


Figura 1.11: Estructura química de algunos macrólidos polienos.

Estos compuestos suelen tener un azúcar unido al anillo macrocíclico por un enlace β -glucosídico. Suele tratarse de un aminoazúcar, generalmente micosamina (3-amino-3,6,-dideoxi-D-manosa) o perosamina (4-amino-4,6-dideoxi-D-manosa), aunque también están descritos azúcares neutros, como 2,6-dideoxi-L-ribohexopiranososa en el caso de la polifungina B.

Un componente de la estructura química muy conservado entre los macrólidos polienos es un grupo carboxilo exocíclico, cuya presencia resulta de relevante importante para la actividad y otras propiedades farmacológicas.

1.4.3 Mecanismo de acción de los macrólidos polienos.

Tanto la actividad biológica como la toxicidad de los macrólidos polienos derivan de un mismo mecanismo de acción, cuya base se encuentra en el carácter anfipático de la molécula y su afinidad por esteroides de membrana, lo que supone una paradoja en el uso clínico de los mismos. Sin embargo, la diferencia en la composición lipídica entre las membranas de hongos y mamíferos permite el uso de este tipo de compuestos, ya que presenta mayor afinidad por el ergosterol presente en las paredes de los hongos que por el colesterol de las membranas plasmáticas de las células animales.

Hasta el momento se han descrito tres mecanismos de acción diferentes basados en la interacción polieno-esterol.

En el caso de polienos de gran tamaño, como son Nistatina y Anfotericina, se ha determinado que la interacción polieno-esterol da lugar a la formación de poros en la membrana celular, a través de los cuales se produce una pérdida tanto de cationes como aniones monovalentes, especialmente K^+ , así como cationes divalentes como el Ca^{2+} , que afecta al potencial de membrana, conduciendo a la muerte celular. Estudios de modelización han estipulado para la Anfotericina B una estructura de poro constituida por ocho moléculas de este heptaeno con ocho de esterol (Figura 1.12), dando lugar a un poro de mayor diámetro en el caso de asociación con el ergosterol que en unión con colesterol. Para mantener la estabilidad de los poros se forman puentes de hidrógeno intramoleculares entre los grupos aminos del azúcar y el grupo carboxilo libre tres carbonos anterior al del azúcar (Baginski, Sternal et al. 2005; Baginski, Czub et al. 2006; Czub, Borowski et al. 2007; Baginski and Czub 2009).

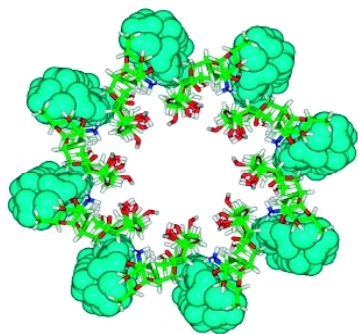


Figura 1.12: Modelo propuesto por Baginski para la estructura del poro formado por la interacción entre ergosterol de la pared celular de hongos y el heptaeno anfotericina B (Baginski, Sternal et al. 2005).

Otro mecanismo es el utilizado por Filipina, un polieno que carece tanto de la micosamina como del carboxilo exocíclico, dos grupos cruciales para la estabilización del poro. Es por eso que, para este compuesto se propone la formación de un complejo planar por interacción con moléculas de esterol (de Kruijff and Demel 1974). Dos de estos compuestos planares formarían una superestructura capaz de embeber la bicapa lipídica, ocasionando así la desintegración funcional de la membrana celular.

Recientes estudios sobre la interacción del tetraeno Pimaricina con moléculas de ergosterol en las membranas de levaduras, han demostrado la falta de cambios en la permeabilidad pese a la aparición de muerte celular (te Welscher, ten Napel et al. 2008). Acorde a esto se ha publicado para Pimaricina un mecanismo no basado en la formación de complejos para la interrupción de la permeabilidad de la membrana, sino en la inhibición de la endocitosis (Van Leeuwen, Golovina et al. 2009).

1.4.4 Aplicaciones de los macrólidos polienos.

A lo largo del tiempo se han ido descubriendo nuevas aplicaciones para los macrólidos polienos, sin embargo la más extendida y tradicional de todas ellas es sin duda el uso clínico frente a infecciones fúngicas.

En la actualidad diversos fármacos de naturaleza poliénica son usados tanto en micosis superficiales como en micosis sistémicas. El máximo representante de este grupo de antifúngicos es el heptaeno Anfotericina B, un fármaco de elección en la lucha frente a las micosis sistémicas, el cual ha sido usado desde hace más de 5 décadas pese a su alta toxicidad.

Basándose en la similitud de la composición lipídica de la pared celular de hongos con la de la membrana celular de algunos parásitos, la Anfotericina B es utilizada

para el tratamiento frente a algunos protozoos, como son el caso de *Leishmania*. (Croft, Seifert et al. 2006) y *Trypanosoma cruzi* (Yardley and Croft 1999).

Otro polieno de aplicación clínica en la lucha frente a hongos es Nistatina, el cual presenta un uso limitado a la vía tópica y una baja toxicidad, por lo que su uso no está tan comprometido como el de Anfotericina B.

Otras propiedades asociadas a los macrólidos polienos son: la capacidad antiviral frente a varios grupos de virus (Kessler, Dixon et al. 1981; Malewicz, Momsen et al. 1984), la estimulación del sistema inmune a bajas concentraciones (Little, Plut et al. 1978), y recientemente se han descrito efectos anti-*scrapie*, para algunos derivados de Anfotericina B (Soler, Caffrey et al. 2008). Por otro lado, se han descrito la aparición de sinergismo con otras drogas, como pueden ser otros antifúngicos o compuestos antitumorales (Valeriotte, Medoff et al. 1984).

Fuera del ámbito clínico encontramos aplicaciones de los macrólidos polienos en la industria alimentaria, concretamente el tetraeno Pimaricina, es usado como conservante alimentario debido a su baja toxicidad. Otros polienos como spinosyn (Jonsson, Miller et al.) son utilizados en la agricultura como insecticidas.

1.4.4.1 Situación clínica actual de las infecciones fúngicas.

Dependiendo de la localización del foco de infección fúngica, podemos hablar de dos tipos de micosis: micosis superficiales, las cuales afecta a piel, mucosas y órganos anejos, y micosis sistémicas que afectan a órganos internos.

Desde hace varias décadas, se ha producido un aumento en la frecuencia y gravedad de las micosis en general, teniendo una mayor repercusión en el caso de las micosis sistémicas, ya que pueden llegar a presentar graves cuadros clínicos que conllevan la muerte del paciente. Dicho incremento se debe, en gran parte, al incremento de sujetos con alteraciones en su estado inmunitario derivado de: ciertas enfermedades (hematológicas, neoplasias, diabetes, inmunodeficiencias, sida, infecciones crónicas), traumatismos (grandes quemados), algunos tratamientos (quimioterapia, radioterapia, corticosteroides, antibióticos, nutrición parenteral, trasplante de órganos...), técnicas instrumentales de diagnóstico o terapéuticas invasivas (catéteres, sondas, cirugía extensa, prótesis), etc. La evaluación del impacto de las micosis invasoras se completa con la aparición de nuevas formas clínicas de micosis no descritas.

Junto con este incipiente aumento en el número de casos de pacientes con micosis nos encontramos con numerosas limitaciones en la lucha terapéutica, ya que son pocas las alternativas farmacológicas de las que se disponen. En la actualidad contamos con 4 grupos de fármacos antifúngicos: polienos, azoles, antimetabolito (análogo a citosina) y equinocandinas.

Los polienos son considerados los fármacos de primera línea en el tratamiento frente a las infecciones fúngicas, su máximo representante para el tratamiento de micosis sistémicas es la Anfotericina B, un heptaeno producido por *Streptomyces nodosus* cuyo uso fue aprobado en los años 50.

La Anfotericina B presenta el mayor espectro de acción antifúngico conocido, incluyendo levaduras como *Candida* y *Cryptococcus* y hongos filamentosos como *Aspergillus*, *Rhizopus* spp y *Fusarium* spp., además este fármaco presenta una baja frecuencia en la aparición de resistencias, aunque se han sido descritos algunos casos (Sanglard, Ischer et al. 2003; Young, Hull et al. 2003; Vandeputte, Tronchin et al. 2007). Estos dos aspectos han permitido el uso satisfactorio de este antifúngico durante 5 décadas pese a la severidad y frecuencia de las reacciones adversas derivadas de su uso. La administración intravenosa de la Anfotericina B está asociada a la aparición de fiebre, escalofríos y otros efectos tardíos como nefrotoxicidad, hipocalcemia y acidosis metabólica, que obligan a la suspensión del tratamiento. Sin duda el efecto adverso que más compromete su uso es la toxicidad renal, pudiéndose observar una disminución del 40% de la filtración glomerular en las 2 primeras semanas de tratamiento. Otra importante limitación de este heptaeno, y que comparte con el resto de polienos, es la baja solubilidad que presenta, esto dificulta la administración intravenosa, al mismo tiempo que disminuye la biodisponibilidad del fármaco.

El hecho de que la Anfotericina B sea la estrella de los antifúngicos pese a su toxicidad ha favorecido el desarrollo de destacados esfuerzos en la búsqueda de sus mejoras farmacológicas. Fruto de estos esfuerzos es el desarrollo de nuevas formulaciones lipídicas (Yardley and Croft 1997; Coukell and Brogden 1998) que han proporcionado mejoría en la solubilidad de las moléculas apolares con el consecuente aumento en la biodisponibilidad, al mismo tiempo que han llevado a una disminución de la nefrotoxicidad. Sin embargo, estas nuevas formulaciones han supuesto un significativo incremento del coste de producción, que vuelve a suponer un problema en términos farmacoeconómicos. Actualmente existen en el mercado tres formulaciones lipídicas:

ABLC (Abelcet, Enzon Pharmaceuticals), ABCD (Amphotec, Intermune), y Ambisome (Astellas).

Como fármacos de segunda línea en el tratamiento de micosis se encuentran los azoles y las equinocandinas.

Dentro de los azoles hay que destacar a los imidazoles y triazoles. Estos fármacos no han supuesto una alternativa definitiva al uso de la Anfotericina B pese a presentar una menor incidencia en la aparición de reacciones adversas, ya que se han observado la aparición de resistencias a los pocos años de aplicación.

Las equinocandinas son los antifúngicos más recientes. Presentan mejoras en la solubilidad con respecto a la Anfotericina B, sin embargo solo son utilizadas en aspergilosis refractarias o en casos de intolerancia a la Anfotericina B.

Tanto las equinocandinas, como el antimetabolito flucitosina, son usados como parte de un tratamiento concomitante con Anfotericina B, de forma que los efectos tóxicos del polieno se ven disminuidos. Esto hace de la terapia combinada la mejor alternativa actualmente disponible en el tratamiento frente infecciones fúngicas. Sin embargo, está desaconsejado el uso conjunto de Anfotericina B con azoles, ya que el mecanismo de acción de estos últimos se basa en la disminución de la síntesis de esteroides, que son a su vez la diana molecular de los polienos (Nosanchuk 2006).

La situación clínica actual donde coinciden el aumento en la incidencia de infecciones fúngicas y las deficiencias en el tratamiento de las mismas, hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Una línea interesante a explotar en esta dirección, es el desarrollo de nuevos polienos, ya que este grupo ha demostrado a través del uso continuado de la Anfotericina B una baja incidencia en la aparición de resistencias. Por su parte, estos nuevos polienos irían en caminados a solventar los problemas de toxicidad derivados del uso del actual fármaco de referencia.

1.5 Desarrollo de nuevos antifúngicos macrólidos polienos.

Para el desarrollo de nuevos compuestos antimicrobianos contamos con cuatro estrategias diferentes:

1. Búsqueda clásica: se basa el *screening* de muestras de suelos con el objetivo de aislar a partir de ellos microorganismos capaces de producir nuevos compuestos bioactivos.
2. Análisis *in silico*: Permiten realizar predicciones que constituyen una base sobre la que desarrollar nuevos compuestos bioactivos.
3. Semisíntesis orgánica: Se trata de realizar cambios en la estructura química de una molécula natural, mediante química orgánica *in vitro*.

En este campo se han desarrollado derivados de algunos macrólidos polienos. Ejemplo de ello son las modificaciones en los grupos carboxilo exocíclico y grupo amido del azúcar de la Anfotericina B, estos han dado lugar a compuestos con mejoras farmacológicas (Cheron, Cybulska et al. 1988; Mazerski and Borowski 1995; Adjou, Demaimay et al. 1999), concretamente los derivados N-metil-N-D-fructosil Anfotericina B y MS-8209 presentan una reducción de la toxicidad con respecto su parental (Saint-Julien, Joly et al. 1992; Szlinder-Richert, Mazerski et al. 2001). También ha sido observado que la bisalquilación de la micosamina en Anfotericina B, Nistatina y Pimaricina da lugar a un aumento de la actividad antifúngica acompañada de una reducción de la actividad hemolítica (Paquet and Carreira 2006). Estas modificaciones mediante química orgánica han mostrado que ciertos cambios en la estructura de los polienos conllevan mejoras en las propiedades farmacológicas. Sin embargo, el gasto económico derivado de la semisíntesis, así como la imposibilidad de obtener ciertos derivados mediante esta vía, debido a la complejidad de la molécula y a los numerosos grupos reactivos, limitan el uso de esta estrategia.

4. Ingeniería genética: Nos permite obtener, una vez conocidos los genes biosintéticos, modificaciones en aquellos genes del *cluster* que pueden originar cambios estructurales en la molécula, susceptibles de proporcionar mejoras farmacológicas.

Modificaciones mediante ingeniería genética en Nistatina:

Streptomyces noursei ATCC 11455 es el productor natural de Nistatina A₁, junto a este son sintetizados una serie de compuestos minoritarios entre los que cabe destacar su análogo heptaeno S44HP (Figura 1.13), cuya actividad hemolítica es superior a la de Nistatina A₁ (Bruheim, Borgos et al. 2004). Mediante la interrupción del dominio ER del

módulo 5 (ER5) se pudo obtener una cepa (ERD44) donde la producción del tetraeno A_1 quedaba abolida en favor del heptaeno S44HP, sin embargo esta delección en el dominio ER5 conlleva una reducción cuantitativa en la producción de polienos (Brautaset, Bruheim et al. 2002). Esta baja producción fue solventada mediante la sustitución en el dominio ER5 de los residuos glicina de las posiciones 5.073 y 5.074 por los aminoácidos serina y prolina respectivamente. En este mismo orden se realizó la sustitución de el residuo serina 4967 del dominio ER5 por una asparragina, dicha mutación dio lugar a la producción conjunta de los compuestos heptaeno y tetraeno (Borgos, Sletta et al. 2006).

El módulo de carga de Nistatina (NysA) presenta un dominio AT con una secuencia que sugiere que es específico de malonil-CoA, y un dominio KS con un residuo serina en el centro activo en lugar de una cisteína, lo que sugiere la presencia de un actividad descarboxilasa (Brautaset, Sekurova et al. 2000). La sustitución de este residuo serina por un aminoácido cisteína, glicina o glutamina no produjo ningún efecto en la producción de polienos. Sin embargo, la sustitución de la AT del módulo 0 por la AT del módulo 3, el cual toma como unidad elongadora malonil-CoA mantiene la producción de Nistatina, poniendo de manifiesto la existencia de una actividad descarboxilasa que aporta, a partir de malonil-CoA, las unidades acetil-CoA necesarias para el inicio de la síntesis de Nistatina y sus derivados. Sea concluido que el residuo serina 413 es esencial para esta actividad carboxilasa. Si bien ha sido demostrado que la unidad iniciadora para la síntesis de Nistatina es acetil-CoA (Caffrey, Aparicio et al. 2008).

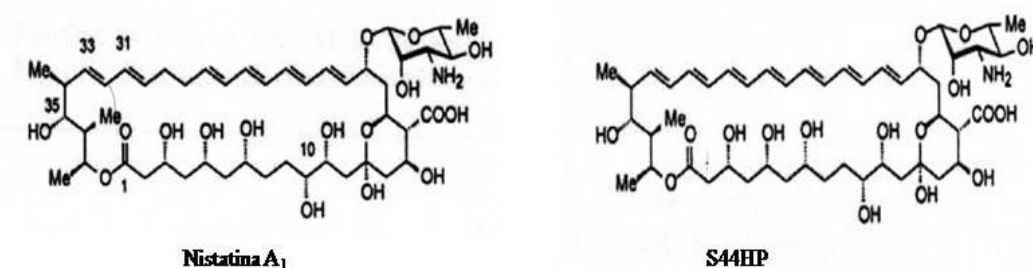


Figura 1.13: Estructuras químicas del tetraeno Nistatina A_3 y su derivado heptaeno S44HP.

La inactivación de los dominios dehidratasa de los módulos 3 (DH3) y 4 (DH4) ha dado lugar a análogos de Nistatina con un grupo alcohol en los carbonos C_{33} y C_{31} respectivamente, en ambos casos dicha modificación originó un aumento en la solubilidad del compuesto mientras que producía efectos negativos sobre la actividad

antifúngica. En base a esto Zotchev y Lancelin sugieren que, para la presencia de actividad antifúngica en un polieno es necesario un tamaño similar entre la cadena polienica y la de poliol (Caffrey, Aparicio et al. 2008).

Modificaciones mediante ingeniería genética en Anfotericina:

La existencia de un compuesto semisintético, Anfotericina B metilester, con menor toxicidad que Anfotericina B, propuso como objetivo la obtención mediante ingeniería genética, de compuestos derivados de la Anfotericina B carentes del carboxilo exocíclico. De este modo y mediante la delección de la región *amphNM* en *S. nodosus* se obtuvieron el heptaeno 16-descarboxil-16 metil anfotericina B y el tetraeno 8-deoxi-16-descarboxil-16 metil anfotericina A, ambos compuestos presentan una menor actividad hemolítica conservando la actividad antifúngica, lo cual supone una mejora farmacológica con respecto a la molécula de la que procede.

La delección de dos módulos de la PKS *AmphC* dio lugar a un productor del derivado pentaeno de Anfotericina B, carente de actividad.

Recientemente se ha conseguido mediante ingeniería genética la incorporación de una perosamina en lugar de una micosamina, dando lugar a 19-(O)-Perosaminil-Anfotericinolido B (Hutchinson, Murphy et al. 2010).

Modificaciones mediante ingeniería genética en Pimaricina:

Streptomyces natalensis es uno de los productores del tetraeno Pimaricina. La inactivación del gen *pimD*, perteneciente al *cluster* de biosíntesis, dio lugar a la aparición del 4,5-deepoxipimaricina, donde el grupo epóxido típico de Pimaricina es sustituido por un doble enlace entre los carbonos C₄ y C₅, estudios de actividad revelaron que la pérdida del grupo epóxido no influye en esta (Mendes, Recio et al. 2001).

La inactivación de *pimK*, que codifica a una glicosiltransferasa, dio lugar a la producción de la aglicona 4,5-deepoxipimaricina, del que se concluye la necesidad de la presencia de la molécula de azúcar para la actividad de este derivado de Pimaricina (Caffrey, Aparicio et al. 2008).

Modificaciones mediante ingeniería genética en Rimocidina y CE-108:

La interrupción del gen *rimG* perteneciente al *cluster* de biosíntesis de los tetraenos Rimocidina/CE-108 en *S. diastaticus* var. 108 dio lugar a la producción de

compuestos donde el carboxilo exocíclico es sustituido por un grupo metilo, a estos compuestos se les dio los nombres de Rimocidina C y CE-108C, este cambio estructural supone una mejora farmacológica en cuanto que presentan una menor toxicidad hemolítica manteniendo la actividad antifúngica (Seco, Fotso et al. 2005). Posiblemente el cambio más prometedor es la conversión del carboxilo exocíclico de los compuestos Rimocidina y CE-108 a sus correspondientes formas amidadas. Se trata de una modificación mediante una actividad post-PKS que da lugar a las correspondientes carboxiamida a las que se les denominó Rimocidina B y CE-108B. Estos compuestos presentan propiedades farmacológicas mejoradas con respecto a sus parentales. Por relación con el presente trabajo esta actividad es detallada ampliamente en el Apartado 1.4.1.2.1 de Introducción.

1.6 Antecedentes y objetivos de este trabajo.

S. diastaticus var. 108 es una cepa aislada de suelo productora de una serie de metabolitos secundarios con actividad antibiótica, entre ellos cabe destacar la presencia de antifúngicos con estructura típica de macrólidos polienos, que como tales son sintetizados mediante una actividad PKS Tipo I.

Los polienos macrólidos producidos mayoritariamente por esta cepa son los tetraenos Rimocidina y CE-108, ambos comparten una misma ruta biosintética, donde la producción de un compuesto u otro está determinada por la elección de la unidad iniciadora sobre la que se realizan el resto de condensaciones; de esta manera, la biosíntesis puede comenzar por la elección de una molécula de butiril-CoA o de acetil-CoA, originándose los compuestos Rimocidina y CE-108 respectivamente (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004). La elección de un metabolito u otro como unidad iniciadora de la biosíntesis va a depender, entre otros factores, de la disponibilidad de los mismos en el interior celular, lo que, depende en gran parte de la composición del medio de cultivo. Se ha observado un aumento en la producción de CE-108 cuando el medio de cultivo es rico en glucosa, ya que este proporciona acetil-CoA vía glucolisis.

Esta capacidad de esta PKS de *S. diastaticus* var. 108, de producir dos cadenas policetónicas diferentes a partir de una misma ruta biosintética pone de manifiesto la versatilidad intrínseca de la misma, que permite, por un lado la elección de butiril-CoA o acetil-CoA por parte de la PKS de arranque, y por el otro, el reconocimiento por parte del resto de PKSs de las dos cadenas policetónicas generadas tras la elección de una u otra unidad iniciadora.

En el análisis mediante HPLC del caldo de cultivo de *S. diastaticus* var. 108 se observaron una serie de compuestos minoritarios con espectro típico de tetraeno, que presumiblemente podrían sintetizarse mediante la misma ruta biosintética.

En base a las estructuras químicas de Rimocidina y CE-108, y mediante el principio de colinealidad se dedujo las unidades incorporadas por cada módulo de elongación y el grado de reducción necesario para la formación de la cadena policetónica cuya ciclación y posteriores modificaciones de adorno, da lugar a la estructura base común a ambos polienos (Figura 1.14). La unidad elongadora utilizada en la biosíntesis de estos 2 polienos es malonil-CoA salvo en los módulos 7, donde se incorpora metilmalonil-CoA y en el módulo 13, que selecciona etilmalonil-CoA, en estos casos se originan las cadenas laterales de la metilo y etilo de los carbonos 12 y 27 (C_{12} y C_{27}) respectivamente, posteriormente el grupo metilo del C_{12} es oxidado hasta ácido carboxílico por acción de un citocromo P-450 (Tabla 1.2).

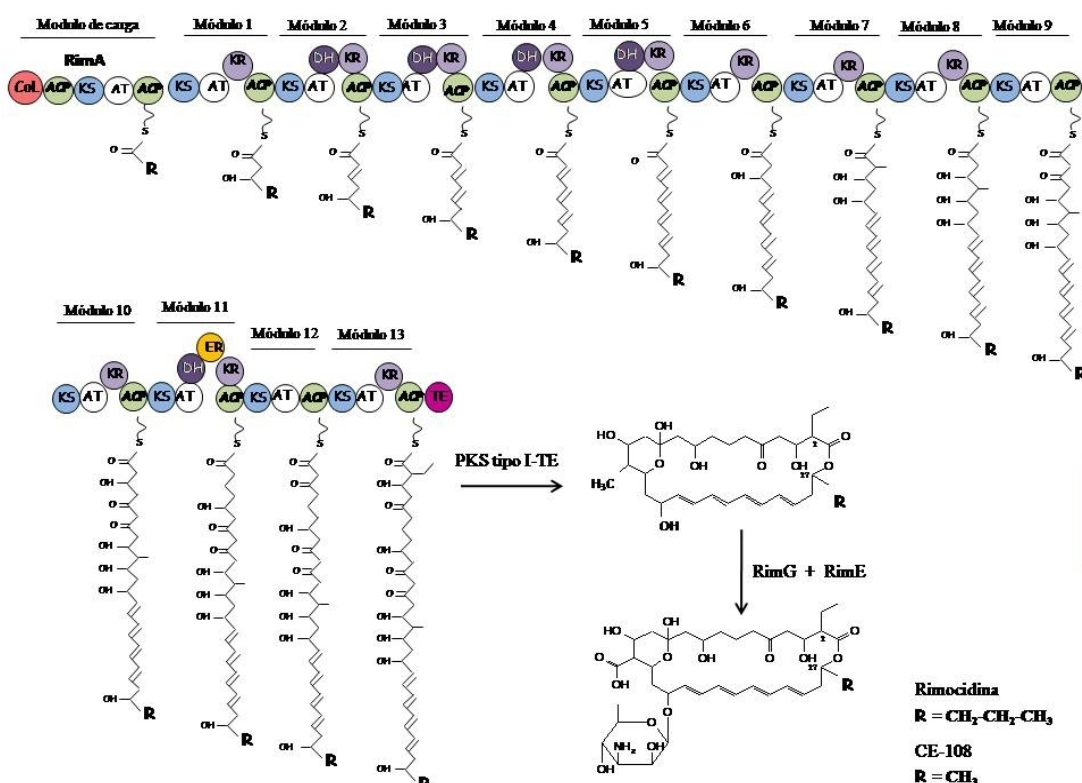


Figura 1.14: Modelo propuesto para la biosíntesis de Rimocidina y CE-108. (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004).

El *cluster* biosintético de estos tetraenos (Figura 1.15) ha sido parcialmente descrito (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004), lo que supone la disponibilidad de algunas herramientas proporcionadas por la tecnología de ADN recombinante.

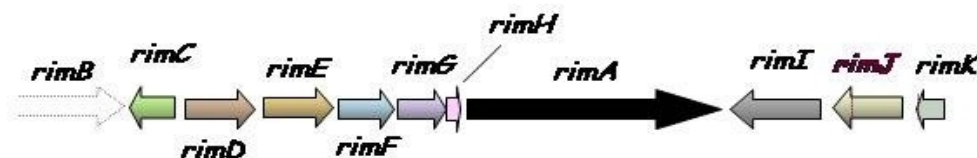


Figura 1.15: Parte de los genes implicados en la biosíntesis de los tetraenos Rimocidina y CE-108 en *S. diastaticus* var. 108 (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004).

En la Tabla 1.2 se nombran los genes descritos hasta el momento pertenecientes o asociados al *cluster* de biosíntesis de Rimocidina y CE-108 en *S. diastaticus* var. 108, así como el tipo de proteína para los que codifican.

Gen	Tipo de proteína para la que codifica
<i>rimA</i>	PKS Tipo I.
<i>rimB</i>	PKS Tipo I
<i>rimC</i>	Tirosina fosfatasa
<i>rimD</i>	Colesterol oxidasa.
<i>rimE</i>	Glicosiltransferasa
<i>rimF</i>	Aminotransferasa
<i>rimG</i>	Citocromo P-450 monooxigenasa
<i>rimH</i>	Ferredoxina
ORF1	Transposasa
<i>rimJ</i>	Crotonil-CoA reductasa
<i>rimK</i>	Acetiltransferas

Tabla 1.2: Genes caracterizados del *cluster* de biosíntesis Rimocidina y CE-108 en *S. diastaticus* var. 108.

En el presente trabajo es de relevante importancia las funciones desempeñadas dentro del proceso biosintético de Rimocidina y CE-108 los genes *rimA* y *rimJ*.

rimA codifica para una PKS Tipo I , también denominada RimA, que se corresponde con la PKS de arranque de la biosíntesis de Rimocidina y CE-108, y por lo tanto es la encargada de tomar la unidad iniciadora butiril-CoA o acetil-CoA.

rimJ codifica para una crotonil-CoA reductasa (CCR), esta enzima cataliza el último paso de la ruta de biosíntesis de butiril-CoA a partir de 2 moléculas acetil-CoA (Wallace, Zhao et al. 1995) (Figura 1.16). El hecho de que este gen se encuentre dentro del *cluster* de biosíntesis hace pensar que sea el responsable de proporcionar al sistema unidades butiril-CoA, para el inicio de la síntesis de Rimocidina, y de etilmalonil-CoA, por carboxilación de butiril-CoA, como unidad de elongación en el módulos 13, que origina la cadena lateral etilo en el C₂₇ tanto en Rimocidina como en CE-108.

La disrupción *in vivo* del gen *rimJ* no bloquea completamente la producción de Rimocidina, aunque si la hace disminuir de forma significativa (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004), sugiriendo la presencia de otro gen funcionalmente equivalente a *rimJ* en el genoma. Por otra parte permitió el aumento de la producción de un compuesto minoritario en la cepa silvestre, con un tiempo de retención inferior al del compuesto CE-108.

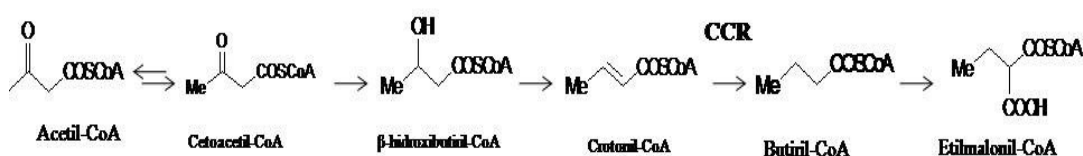


Figura 1.16: Ruta metabólica para la obtención de butiril-CoA y etilmalonil-CoA a partir de acetil-CoA.

Mediante manipulación genética se obtuvo el recombinante *S. diastaticus* var108/743B, el cual contenía un plásmido derivado del pIJ922, con el *rimA* bajo el promotor de xilanas (xysAp) y el gen de resistencia a Eritromicina (*ermE*). El análisis mediante HPLC del caldo de cultivo del recombinante genético desveló la presencia de dos nuevos compuestos a los que se les dio el nombre de Rimocidina B y CE-108B (Seco, Cuesta et al. 2005), tras la determinación de sus estructuras químicas quedó de manifiesto que se trataban de las correspondientes amidas de los compuestos Rimocidina y CE-108 (Figura 1.17).

Los ensayos de actividad antifúngica y hemolítica de los cuatro tetraenos (Seco, Cuesta et al. 2005), reveló una mayor toxicidad de los compuestos amidados frente a microorganismos con ergosterol en sus membranas, que sus correspondientes parentales, sin embargo, mantienen la misma toxicidad hacia células con colesterol. Esta situación supone una ventaja desde el punto de vista farmacológico, ya que los compuestos

amidados se presentan con una menor toxicidad con la misma actividad que sus parentales.

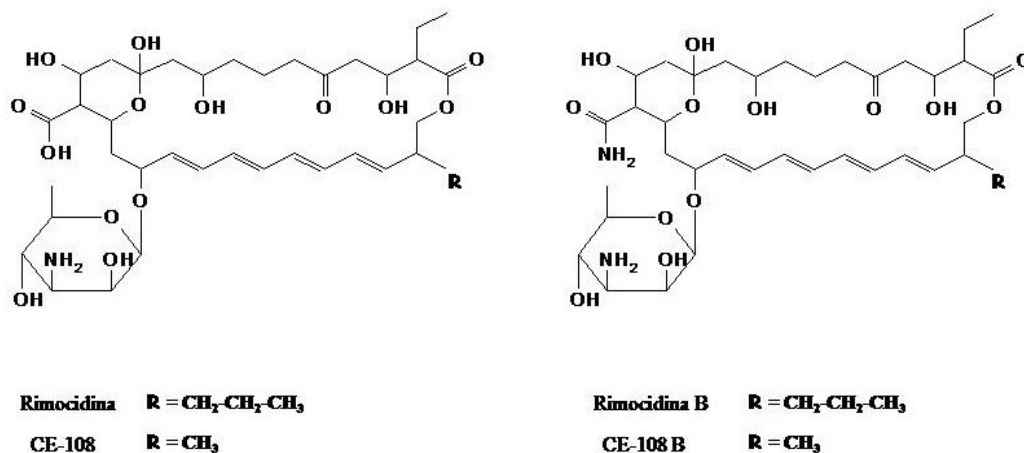


Figura 1.17: Estructuras químicas de los tetraenos Rimocidina, CE-108, Rimocidina B y CE-108B.

Posteriormente fue confirmada la producción de los compuestos amidados como consecuencia de una modificación de adorno producida por una actividad amidotransferasa presente en la *S. diastaticus* var. 108 (Seco, Fotso et al. 2005), sin quedar dilucidado el porqué estos compuestos amidados no son producidos en cantidades detectables en la cepa silvestre pese a poseer dicha actividad. Finalmente fue caracterizado el gen *pcsA*, responsable de dicha actividad (Seco, Miranzo et al. 2010), y del cual se ha hablado ampliamente en el Apartado 1.4.1.2.

Con estos antecedentes consideramos a *S. diastaticus* var. 108 una herramienta idónea para que, mediante la explotación de sus características genéticas, como son: la versatilidad en las unidades iniciadoras de la cadena policetónica y la presencia de una actividad de adorno amidotransferasa frente a tetraenos, que proporciona mejoras farmacológicas en éstos, podamos obtener nuevos compuestos polienos de baja toxicidad y buena actividad biocida que puedan, en un futuro, suponer una alternativa terapéutica en la lucha frente a las infecciones fúngicas.

Para este objetivo consideramos necesario:

1. La obtención de recombinantes genéticos de *S. diastaticus* var. 108 orientada a una producción optimizada de metabolitos bioactivos.

2. Caracterización y análisis de compuestos presentes en los caldos de cultivo de *S. diastaticus* var. 108 y sus recombinantes genéticos.
3. Análisis de expresión y manipulación de genes responsables de modificaciones de “adornos” que puedan conducir a compuestos con mejoras farmacológicas.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Vectores.

Los vectores utilizados para la realización de este trabajo se presentan en la Tabla 2.1.

Vector	Características	Referencia
PM1	Actinofago derivado de (ϕ C31, tsr^r , hyg^r , (att^r).	(Malpartida and Hopwood 1986).
pUC19	Vector para clonaje en <i>E. coli</i> amp^r β gal.	(Yanisch-Perron, Vieira et al. 1985).
PM1	Actinofago derivado de ϕ C31, tsr^R , hyg^R , (att).	(Malpartida and Hopwood 1986).
pIJ2925	Vector para clonaje en <i>E. coli</i> amp^r β gal.	(Janssen and Bibb 1993).
pHJL401	Plásmido bifuncional amp^r tsr^r .	(Larson and Hershberger 1986).
pLEC101	Fragmentos <i>BglIII-HindIII</i> (1.1Kb) de pSM502 y <i>HindIII-XbaI</i> (1.2Kb) de pSM500 coligados en el vector pAGe-1 digerido con <i>BglIII-XbaI</i> .	Este trabajo.
PM1-pLEC101	Fago derivado del PMI donde el fragmento <i>PstI-BglIII</i> conteniendo el gen de resistencia a Tioestreptona es sustituido por el fragmento <i>BglIII-PstI</i> (4,1 Kb) de pLEC101. Resistente a Eritromicina.	Este trabajo.
PM1-709	Fragmento <i>SacI-XbaI</i> de 1,1 Kb rescatado de pEL-709 clonado en los sitios de restricción <i>SacI-BamHI</i> de PM1.	(Seco, Perez-Zuniga et al. 2004).

pIJ2925	Vector para clonaje en <i>E. coli</i> amp ^r βgal.	(Janssen and Bibb 1993).
PM1/709B.	Fago derivado del PMI, obtenido mediante la ligación conjunta del fragmento <i>XhoI-BglII</i> de 1.8 Kpb procedente del plásmido del pAGE, y el fragmento <i>BamHI-SacI</i> de 840 pb procedente del plásmido pSM709 en los sitios de restricción <i>XhoI-SacI</i> del PMI. Resistencia a Eritromicina como marcador.	Este trabajo.
pMS742	Fragmento <i>BstEII-NcoI</i> (3,3Kb) y <i>NcoI-BglII</i> (1Kb) procedentes del plásmido pL76B11 clonados simultáneamente en pIJ2925 <i>BamHI-SacI</i> .	Comunicación personal E. Seco.
pSM780	Plásmido derivado de pHJL401 por incorporación de OriT y el promotor de resistencia a Eritromicina (<i>PerME</i> [*]).	(Seco, Miranzo et al. 2010).
pSM783	Fragmento correspondiente a <i>rimA</i> clonado en <i>BamHI-SacI</i> del pSM780 bajo el control del promotor <i>PerME</i> [*] .	Comunicación personal E. Seco.
pSM500	Fragmento <i>SacI</i> (1.1 Kb) del gen <i>rimA</i> clonado en pIJ2925/ <i>SacI</i> .	Comunicación personal E. Seco.
pSM502	Fragmento <i>SacI</i> (1,2 Kb) del gen <i>rimA</i> clonado en pIJ2925/ <i>SacI</i> .	Comunicación personal E. Seco.
pSOKNRC	Gen híbrido <i>rimA-nysA</i> , con el dominio AT procedente de <i>rimA</i> , clonado en el vector pSOK101.	Comunicación personal S. Zotchev.
PSOKNRD	Gen híbrido <i>rimA-nysA</i> , con el dominio AT procedente de <i>nysA</i> , clonado en el vector pSOK101.	Comunicación personal S. Zotchev.

Cos 37	<i>Cos</i> 31 conteniendo parte del <i>cluster</i> de biosíntesis de Pimaricina incluyendo <i>pimS0</i> .	(Aparicio, Colina et al. 1999).
pLEC104C	Clon obtenido al ligar el fragmento de 3,2 kb <i>NcoI-BglII</i> procedente del plásmido pSOKNRC y el inserto <i>BglII-XbaI</i> de 1 kb, rescatado del plásmido pSM742, en el vector pSM783 liberado del fragmento <i>NcoI-XbaI</i> , restableciéndose el gen híbrido <i>rimA-nysA</i> , con el dominio AT procedente de <i>rimA</i> , bajo el promotor <i>Perme*</i> precedido de OriT.	Este trabajo.
pLEC106D	Clon obtenido al ligar el fragmento <i>NcoI</i> de 3,3 Kb, rescatado del plásmido pSOKNRD, en el plásmido pLEC104C liberado del fragmento <i>NcoI</i> de 3,2 Kb, restableciéndose el gen híbrido <i>rimA-nysA</i> , con el dominio AT procedente de <i>rimA</i> , bajo el promotor <i>Perme*</i> precedido de OriT.	Este trabajo.
pCUE109	Fragmento <i>XmnI</i> (romo) de 7 Kb. procedente del cósmido Cos37 clonado en el vector pIJ2925 <i>HincII</i> .	Este trabajo.
pLEC108	Clon obtenido al ligar el fragmento rescatado como <i>SacI-EcoRI</i> procedente del plásmido pCUE9, conteniendo el gen <i>pimS0</i> , en los sitios <i>SacI-EcoRI</i> del vector pSM780.	Este trabajo.
pLEC303	Clon obtenido al ligar el fragmento <i>EcoRI-BglII</i> portador del gen <i>pcsA</i> con 6 histidinas en el extremo 5', en el vector pIJ2925 digerido con <i>EcoRI-BamHI</i> .	Este trabajo.
pLEC304	Clon obtenido al ligar simultáneamente el fragmento <i>HindII-NarI</i> de 2Kb procedente del plásmido pSM858 y el inserto <i>NarI-EcoRI</i> de 1 Kb rescatado del plásmido Dog 47 en el vector pSM858 liberado de la banda <i>HindII-EcoRI</i> de 3Kb, dando lugar al gen híbrido de amidotransferasa con el dominio glutaminasa de <i>pcsA</i> y el sintasa de <i>pcsB</i> con una cola de 6 histidinas en el extremo 5', expresado bajo el promotor <i>Perme*</i> y precedido de OriT.	Este trabajo.

pLEC307	<p>Clon obtenido al ligar simultáneamente el fragmento <i>HindII-NarI</i> de 2Kb procedente del plásmido pSM858 y el inserto <i>NarI-EcoRI</i> de 1 Kb rescatado del plásmido Dog 35 en el vector pSM858 liberado de la banda <i>HindII-EcoRI</i> de 3Kb, dando lugar al gen híbrido de amidotransferasa con el dominio glutaminasa de <i>pcsA</i> y el sintasa de <i>pcsB</i>, expresado bajo el promotor <i>PermE*</i> y precedido del OriT.</p>	Este trabajo.
pLEC305	<p>Clon obtenido al ligar simultáneamente el fragmento <i>BglII-NarI</i> de 747pb procedente de la amplificación por PCR del plásmido Dog 35 con los oligos AsnB.rgu3-780 uni y AsnB.rgu3-780 rev, y el fragmento <i>NarI-EcoRI</i> de 1 Kb rescatado del plásmido pSM858 en los sitios de restricción <i>BamHI-EcoRI</i> del vector pSM780, dando lugar al gen híbrido de amidotransferasa con el dominio glutaminasa de <i>pcsB</i> y sintasa de <i>pcsA</i>. bajo el promotor <i>PermE*</i> y precedido de OriT.</p>	Este trabajo.
pLEC113	<p>Fragmento romo de 383pb, interno al plásmido pLEC307, el cual se obtuvo mediante amplificación por PCR con los oligos asnB-<i>SacI</i>(1147)uni. y asnB-<i>XmnI</i>(1530)rev. introduciendo un sitio <i>SacI</i> en el extremo 3', clonado en el sitio de restricción <i>SmaI</i> del vector pUC19.</p>	Este trabajo.
pLEC308	<p>Clon obtenido al ligar simultáneamente los fragmentos <i>XmnI-EcoRI</i> de 350pb procedente del plásmido Dog 45 y <i>SacI-XmnI</i> de 380pb rescatado del plásmido pSM858, en el vector pSM858 liberado del fragmento <i>SacI-XmnI</i> de 730 pb, dando lugar al gen híbrido de amidotransferasa con los dominios glutaminasa y sintasa de <i>pcsA</i> y 317 pb del extremo 5' de <i>pcsB</i> expresado bajo el promotor <i>PermE*</i> y precedido de OriT.</p>	Este trabajo.

pLEC309	Clon obtenido al ligar simultáneamente los fragmentos <i>SacI-XmnI</i> de 380 pb procedente del plásmido pLEC113, <i>XmnI-EcoRI</i> de 400pb recatado del plásmido pSM858 y el fragmento <i>EcoRI-SacI</i> de 6kb rescatado del vector pSM858, que da dando lugar al gen híbrido de amidotransferasa, donde los aa del 1147 al aa1530 son sustituidos en <i>pcsA</i> por la correspondiente secuencia del gen <i>pcsB</i> , expresado bajo el promotor <i>PerME*</i> y precedido de OriT.	Este trabajo.
pSM858	Fragmento <i>BglII-EcoRI</i> obtenido mediante amplificación por PCR, conteniendo el gen <i>pcsA</i> , clonado en los sitios <i>BamHI-EcoRI</i> del vector pSM780.	(Seco, Miranzo et al. 2010).
pDog35	Fragmento <i>SacI</i> de 3Kb procedente del plásmido Dog31 que contiene el gen <i>pcsB</i> clonado en el sitio de restricción <i>SacI</i> del plásmido pUC19.	(Miranzo, Seco et al. 2010).
pDog47	Fragmento <i>NdeI-HindIII</i> de 1,8 Kb (romo) procedente del plásmido pDog43, que contiene el gen <i>pcsB</i> con una cola de 6 histidinas, clonado en los sitios <i>NdeI-BamHI</i> (romo) del plásmido pIJ8600.	Comunicación personal D. Miranzo.

Tabla 2.1: Fagos y plásmidos utilizados o construidos en este trabajo.

2.2 Microorganismos utilizados.

Los microorganismos utilizados para el desarrollo de este trabajo se encuentran reflejados en la siguiente tabla:

Organismo	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> JM101	supE thiΔ(lac-proAB) (F' traD36 proAB lac ^q ZΔM15).	(Yanisch-Perron, Vieira et al. 1985).
<i>Escherichia coli</i> LH12567oli	Dam- , dcm-.	(MacNeil, Gewain et al. 1992).

<i>Escherichia coli</i> DH5 _α	fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17.	(Taylor, Walker et al. 1993).
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108	Cepa silvestre productora de Rimocidina y CE-108.	(Seco, Perez-Zuniga et al. 2004).
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101	Cepa derivada de la cepa silvestre con el gen <i>rimA</i> interrumpido por la integración del fago PM1/pLEC101. No productor de tetraenos.	Este trabajo.
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101-pSM780	<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101 transformado con el plásmido pSM780. No productor de tetraenos.	Este trabajo.
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101-pSM783	<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101 transformado con el plásmido pSM783. Productor de CE-108 y Rimocidina.	Este trabajo.
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101-pLEC108	<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101 transformado con el plásmido pLEC108.	Este trabajo.
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101-pLEC104C	<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101 transformado con el plásmido pLEC104C.	Este trabajo.
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101-pLEC106D	<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/pLEC101 transformado con el plásmido pLEC106D.	Este trabajo.
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1-709	Cepa derivada de la cepa silvestre con el gen <i>rimJ</i> interrumpido por la integración del fago PM1-709.	(Seco, Perez-Zuniga et al. 2004).

<i>Streptomyces diastaticus</i> 108::PM1/709B	Cepa derivada de la cepa silvestre con el gen <i>rimJ</i> interrumpido por la integración del fago PM1/709B.	Este trabajo.
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1/709B- pSM858.	<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108::PM1-709B transformado con el plásmido pSM858.	Este trabajo.
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108-3730	Cepa derivada de la cepa silvestre obtenida por estrés térmico. Productora de tetraenos amidados.	Este trabajo.
<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108-pLEC303	<i>Streptomyces diastaticus</i> var. 108 transformado con el plásmido pLEC303.	Este trabajo.
<i>Streptomyces lividans</i> TK21	SLP2-, SLP3	(Hopwood, Kieser et al. 1983).
<i>Streptomyces lividans</i> TK21/pLEC307	Cepa derivada de la cepa silvestre con el gen híbrido <i>pcsA-pcsB</i> procedente del plásmido pLEC307.	Este trabajo.
<i>Streptomyces lividans</i> TK21/pLEC306	Cepa derivada de la cepa silvestre con el gen híbrido <i>pcsA-pcsB</i> -His-tag procedente del plásmido pLEC306.	Este trabajo.
<i>Streptomyces lividans</i> TK21/pLEC305	Cepa derivada de la cepa silvestre con el gen híbrido <i>pcsA-pcsB</i> procedente del plásmido pLEC305.	Este trabajo.
<i>Streptomyces lividans</i> TK21/pLEC308	Cepa derivada de la cepa silvestre con el gen híbrido <i>pcsA-pcsB</i> procedente del plásmido pLEC308.	Este trabajo.
<i>Streptomyces lividans</i> TK21/pLEC309	Cepa derivada de la cepa silvestre con el gen híbrido <i>pcsA-pcsB</i> procedente del plásmido pLEC309.	Este trabajo.
<i>Penicillium chrysogenum</i> ATCC10003		ATCC10003

<i>Aspergillus niger</i>	ATCC1004
<i>Filobasidiella neoformans</i>	CECT1078*
<i>Issatchenkia orientalis</i>	CECT10688**

Tabla 2.2: Microorganismos utilizados en este trabajo. CECT: Colección Española Cultivos Tipo.

ATCC: American Type Culture Collection.

*Microorganismo tipo: *Cryptococcus neoformans*. **Microorganismo tipo: *Candida krusei*.

2.2.1 Crecimiento y conservación

Las cepas de *Escherichia coli* se crecieron a 37°C tanto en medio sólido como líquido; en este último caso, a una agitación de 250 r.p.m. Se conservaron como suspensiones celulares en glicerol al 20% a una temperatura de -20°C. Las cepas de *E. coli* utilizadas más frecuentemente también se conservaron mediante resiembra periódica en placas de agar con el medio de cultivo adecuado y los suplementos necesarios. Las placas se mantuvieron selladas con Parafilm (Pechiney, Chicago IL, EE.UU.) a 4°C para su mejor conservación.

Las cepas de *Streptomyces* se crecieron en los diferentes medios de cultivo a la temperatura de 30°C (salvo cuando se indica otra temperatura) y a una agitación de 250 r.p.m. para los medios líquidos. La conservación se realizó mediante suspensión de esporas en glicerol al 20% a una temperatura de -20°C. Para obtener las esporas de las diferentes cepas se sembró el microorganismo en placas de R5. Las placas se incubaron a 30°C durante un tiempo estimado de 6-7 días. Las esporas se recogieron con la ayuda de un asa de siembra estéril, se filtraron a través de un filtro de algodón hidrófilo estéril, se centrifugaron 10 minutos a 4000 r.p.m., se lavaron con H₂O estéril y se resuspendieron en un volumen adecuado de glicerol 20% para su posterior congelación. (Hopwood 1985) Aquellas cepas cuya esporulación es defectuosa se conservaron como micelio congelado obtenido a partir de cultivo líquido, el micelio fue recogido, lavado y resuspendido en sacarosa 10% y conservado a -20°C.

P. chrysogenum y *A. niger* se crecieron sobre medio PDA a 30°C hasta su esporulación. Las esporas fueron recogidas, lavadas en agua por centrifugación y conservadas en glicerol 20% a -20°C. *F. neoformans* e *I. orientalis* se crecieron sobre medio YEPD a 37°C y se conservaron como suspensión celular en 20% glicerol a -20°C.

2.2.2 Medios de cultivo de *E. coli*.

LB- (*Luria-Bertani*): Medio utilizado para el cultivo de *E. coli* (Sambrook , 1989).

2.2.3 Medios de cultivo de *Streptomyces*.

YEME- (*Yeast Extract, Malt Extract*) Medio de cultivo líquido usado para la extracción de plásmidos y ADN total de *Streptomyces* (Hopwood 1985).

DNB- (*Difco Nutrient Broth*) Se utilizó para la preparación de suspensiones de fagos de *Streptomyces* (Hopwood 1985).

DNA- (*Difco Nutrient Agar*: Medio utilizado para la obtención de alto título y ADN de actinofagos (Hopwood 1985).

SNA- (*Soft Nutrient Agar*) Agar de cobertura (Hopwood 1985).

R5- Medio de cultivo usado para transfecciones y transformaciones así como para la obtención de esporas (Hopwood 1985).

TSB- (*Tryptone Soya Broth 3%*): Medio de cultivo líquido usado para extracción de plásmido (Hopwood 1985).

SYM2- Medio de crecimiento para la producción de antibióticos. Fue utilizado para la obtención de extractos acelulares a partir de los cuales se realizaron los ensayos de actividad de proteínas (Atlas, 1993).

2.2.4 Otros medios de cultivo.

PDA -Potato Dextrose Agar (Extracto de patata 0.4%, glucosa 2%). Fue utilizado para la obtención de esporas de los hongos; *P. chrysogenum* y *A. niger*.

RPMI- Medio sintético RPMI 1640 con glutamina de Sigma tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164M ajustando el pH entre 6,9 y 7. Fue utilizado como medio de crecimiento de hongos y levaduras en los ensayos de determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias.

YEPD-Yeast Extract Peptone Dextrose (Extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%). Medio de cultivo usado para el crecimiento de levaduras.

2.3 Selección con antibiótico.

Los antibióticos utilizados para la selección de cepas resistentes tanto de *Streptomyces* como de *E. coli* se muestran en la Tabla 2.3.

Antibiótico	<i>Streptomyces</i> en medio sólido	<i>Streptomyces</i> en medio líquido	<i>E. coli</i> en medios sólido y líquido
Ampicilina			100
Cloranfenicol			35
Tetraciclina			10
Apramicina	50	50	100
Tiostreptona	50	10	
Eritromicina	200	100	

Tabla 2.3: Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) usadas para la selección en medio sólido y en medio líquido de los distintos antibióticos para *Streptomyces* y *E. coli*.

La preparación de los antibióticos Ampicilina y Apramicina se realizó, mediante disolución en agua destilada y posterior esterilización por filtración con filtros Millipore de $0.45\mu\text{m}$ (Millipore corp. Bedford MA, EE.UU.). Para Cloranfenicol y Eritromicina el solvente utilizado fue etanol 100%, y al 50% etanol para Tetraciclina, la solución de trabajo de Tiostreptona se preparó en DMSO a $50\mu\text{g/ml}$, en estos casos no precisaron de otro tipo de esterilización.

2.4 Reactivos.

En la preparación de medios de cultivo, tampones y soluciones se utilizaron los productos químicos suministrados por las casas comerciales Boehringer, Difco, Merck, Pharmacia y Sigma; las enzimas utilizadas para la manipulación de ácidos nucleicos fueron suministradas por Ambion, Applied Biosystems, Biolabs, Biotech, Boehringer, Fermentas Pharmacia y Roche.

2.5 Aislamiento de ADN.

2.5.1 Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli*.

Para el aislamiento de ADN plasmídico procedente de *E. coli* se siguió el método de lisis alcalina descrito por Birnboim (Birnboim 1983). Para la preparación de aquellas muestras que posteriormente fueron secuenciadas se utilizó el kit Plasmid Miniprep Kit de Biorad (Ref.:732-6100).

2.5.2 Aislamiento de ADN plasmídico de *Streptomyces*.

El aislamiento de ADN plasmídico procedente de *Streptomyces* se realizó mediante una modificación del método de Birnboim (1983) publicada por Hopwood (Hopwood 1985).

2.5.3 Aislamiento de ADN total de *Streptomyces*.

La extracción del ADN total de las distintas especies de *Streptomyces* se realizó según el método descrito por Hopwood (Hopwood 1985).

2.6 Aislamiento de ADN de fagos de *Streptomyces*.

La preparación de ADN de actinofagos se realizó siguiendo el protocolo descrito por Hopwood (Hopwood 1985). *Streptomyces lividans* TK21 fue utilizado como cepa infectiva.

2.7 Obtención de alto título de fago.

Para la obtención de alto título de actinofagos se siguió el protocolo descrito previamente (Hopwood 1985).

2.8 Introducción de ADN.

2.8.1 Transformación de *E. coli*.

Se prepararon células competentes de *E. coli* JM101, DH5 α y ET12567 siguiendo el protocolo descrito por (Brown et al. 1979). Una vez preparadas se alicuotaron y conservaron a -80°C. Para las transformaciones de los plásmidos con los híbridos de PKS se utilizaron competentes con una eficiencia del orden 10⁹.

2.8.2 Transformación de *Streptomyces*.

Para la transformación de *Streptomyces lividans* TK21 se prepararon protoplastos que se transformaron según el método previamente descrito (Hopwood 1985). En el caso de *Streptomyces diastaticus* var. 108 y sus recombinantes genéticos, el micelio para la obtención de protoplastos fue crecido durante 48 horas en medio TSB suplementado con glicina al 0,5% y $MgCl_2$ 5mM. El micelio se trató con lisozima durante 90 minutos. Para la selección se añadió medio SNA con el antibiótico adecuado tras una incubación de 16 horas a 30°C.

2.8.3 Transfección de *Streptomyces*.

El método utilizado para la transfección en *Streptomyces* fue el descrito por Hopwood (Hopwood 1985).

2.8.4 Infección en *Streptomyces*.

A partir de suspensiones de alto título de un actinofago obtenido mediante transfección en *S. lividans* TK21, se infectaron esporas de *Streptomyces diastaticus* var. 108 según el método descrito por Hopwood (Hopwood 1985).

2.9 Manipulación enzimática del ADN.

2.9.1 Digestión del ADN.

Las digestiones de ADN con endonucleasas de restricción se llevaron a cabo bajo las condiciones recomendadas por las casas comerciales para cada una de las enzimas

2.9.2 Desfosforilación de extremos cohesivos.

Para evitar la recircularización de aquellos vectores digeridos con una única endonucleasas de restricción, y que iban a ser utilizados para posteriores ligaciones, se llevó a cabo un proceso de desfosforilación de extremos cohesivos mediante el tratamiento de los mismos con fosfatasa alcalina. La reacción de desfosforilación se llevó a cabo añadiendo una unidad enzimática de fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania. Ref. 1097 075) por cada 50 picomoles de ADN de extremos 5' e incubando a 37°C durante una hora (Sambrook et al. 1989). La inactivación de la misma se realizó por extracción con fenol de la mezcla de reacción.

2.9.3 Ligación de fragmentos de ADN.

Se utilizó la enzima ADN ligasa del Bacteriófago T4 y se tuvieron en cuenta las recomendaciones de Sambrook (Sambrook et al. 1989), poniendo un exceso molar del fragmento de ADN a clonar del orden de cuatro veces respecto al vector en los casos en que la ligación no fuera dirigida. Las reacciones fueron llevadas a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas para extremos protuberantes. En el caso de ligación de extremos romos, la reacción fue llevada a cabo a 16°C durante toda la noche.

2.9.4 Amplificación de ADN por PCR.

Las amplificaciones de ADN por reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se llevaron a cabo según las recomendaciones que la casa comercial Roche (Basel, Suiza) hace para su kit Pwo SuperYield DNA Polymerase. La temperatura de hibridación utilizada fue de 55°C. Los moldes empleados fueron tanto plásmidos como ADN total de *Streptomyces*. El programa de amplificación utilizado se describe en la Tabla 2.4.

Número de ciclos	Duración	Temperatura
1	5min	95°C
10	2min	97°C
	1min	55°C
	2min	72°C
25	2min	95°C
	1min	Tm
	2min	72°C
1	7min	72°C

Tabla 2.4: Programa de amplificación por PCR de los fragmentos de ADN.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se encuentran descritas en la Tabla 2.5.

Oligonucleótidos	Secuencia (5'-3')
asnB3.RGU5.3.780rev	GCGCTTAAGGGTCAGGCCACTCGGATGTC
asnB3.RGU5.3.780rev	GCGCTTAAGGGTCAGGCCACTCGGATGTC
asnB- <i>SacI</i> (1147).uni.	TGAGACGGCGGACGAGCTCTTCGGCGG
asnB- <i>XmnI</i> (1530).rev	TCCCTGCCGTCGAAGCTCTTCATCGCC
HrdB.D	CGCGGCATGCTCTTCCT
HrdB.R	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC
AsnB.uni	GGCATCAAGCCCTTCTACTT
AsnB.rev	GATCACCCGCTTGAACATC
rimA.uni	GCTGACCTCGGTGATGTG
rimA.rev	GGACTCGTACAGCCGGTAG

Tabla 2.5: Oligonucleótidos utilizados para este trabajo en las reacciones de amplificación por PCR o secuenciación de los fragmentos de ADN.

2.10 Electroforesis de ADN.

2.10.1 Electroforesis en geles de agarosa.

Las moléculas de ADN con una cantidad de tampón de carga apropiada se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa preparados en tampón TBE, a los que se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0.5µg/ml. La concentración de agarosa (agarose D-1 medium EEO. ref.8021, Pronadisa. Madrid, España) utilizada para la preparación de los geles fue generalmente de 0.7% excepto en aquellos casos en los que era necesario separar fragmentos de un tamaño menor, usando un porcentaje de agarosa de hasta 1.3%, (Sambrook et al. 1989). Las soluciones utilizadas presentaban la siguiente composición: tampón TBE: Tris-HCl 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM pH8; tampón de carga para ADN (5X): azul de bromofenol 0.25%, sacarosa 40%, Tris-HCl 10mM pH8, EDTA 10mM; bromuro de Etidio: solución 10mg/ml en agua.

2.10.2 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.

El fragmento de ADN para purificar, una vez digerido convenientemente con la/s enzima/s de restricción adecuadas, se electroeluyó en tampón TBE 1% en bolsas de

diálisis, según Maniatis et al., 1982. A continuación se trató con fenol:cloroformo y se precipitó en presencia de acetato sódico 0.3M y un volumen de isopropanol.

Ocasionalmente se utilizó el kit de Perfectprep Gel Cleanup (ref. 955152000. Eppendorf. Hamburgo, Alemania).

2.11 Hibridación de ADN.

2.11.1 Transferencia de ADN desde geles de agarosa: Southern blot.

El ADN previamente digerido con las enzimas de restricción adecuadas fue transferido desde geles de agarosa a membranas de nylon (Hybond-N, ref. RCP203N. Amersham Biosciences. Buckinghamshire, Reino Unido) según la técnica descrita por (Southern 1975). La transferencia del ADN fue facilitada mediante el fraccionamiento del DNA por irradiación de luz ultravioleta de onda corta durante 2-3 min.

Una vez realizada la transferencia, la fijación del ADN a la membrana de nylon se llevó a cabo por vacío a 80°C durante 2 horas.

2.11.2 Prehibridación, hibridación y marcaje del ADN transferido.

Se utilizaron los reactivos y protocolos del AlkPhos Direct Labelling (ref. RPN3680. GE Healthcare. Buckinghamshire, Reino Unido).

2.12 Secuenciación de ADN.

La secuenciación de ADN fue llevada a cabo por la empresa Secugen S.L (España), utilizando el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos (Sanger, Nicklen et al. 1977). Los oligonucleótidos usados para dicho fin se encuentran en la Tabla 2.5.

2.13 Aislamiento y purificación de ARN.

Para el aislamiento de ARN se utilizó un método híbrido en el cual, la lisis del micelio se lleva a cabo mediante el método tradicional descrito por Kirby (Kirby, Fox-Carter et al. 1967), y posteriormente tratado con el kit de extracción de RNA, Rneasy Midi (ref. 75142) de Qiagen (Dusseldorf, Alemania).

El micelio proveniente de 50 ml de cultivo en medio SYM2 se sometió a un proceso de fuerte agitación en presencia de 5 ml tampón de lisis (SDS 1%, EDTA 160mM pH 8), bolas de vidrio de 3 mm de diámetro y 1 ml fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1). A continuación se añadieron 4 ml de tampón RTL del kit Rneasy Midi y 40 µl de β-mercaptoetanol con una nueva agitación vigorosa. Tras esto, se añadieron otros 8 ml de fenol/cloroformo/isoamílico para extraer las proteínas de la muestra. Luego se continuó con el protocolo según las indicaciones del fabricante hasta tener la preparación final.

2.14 Ensayos de RT-PCR.

Una vez extraído el ARN y verificado un aceptable grado de pureza mediante Bioanalyzer (llevado a cabo por el servicio de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología) la muestra fue tratada con DNA-free kit de Ambion (Austin, E.E.U.U.) según las especificaciones de la casa comercial.

Para la conversión del ARNm (ARN mensajero) en ADNc (ADN complementario) se utilizó la transcriptasa reversa con oligonucleótidos aleatorios del High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, E.E.U.U.), según las recomendaciones del fabricante. Las concentraciones de ADNc resultante fueron estimadas por *Nanodrop*, estimándose entre 1000-1200 ng/µl.

La amplificación a partir de ADNc se realizó en un amplificador Applied RT-PCR 7300 de Applied Biosystems (Foster City, E.E.U.U.). La mezcla de reacción para la detección de cada gen se obtuvo mezclando 2 µmoles de cada oligo, (Tabla 2.5), 60 ng de cDNA, 12,5 µl POWER SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, E.E.U.U.) y H₂O hasta completar 25 µl de volumen final.

Para el diseño de oligos se utilizó el programa *Primer3 Software Tools*, al que se le asignó los siguientes parámetros: un tamaño de amplicón mínimo de 50 pb, máximo de 150 pb y óptimo de 100 pb; una estabilidad máxima 3' de 7; T_M mínima 58, máxima de 60°C y óptima de 59°C; y una diferencia máxima de 2°C entre las T_M de cada oligo. Los oligos propuestos por el programa fueron analizados para elegir la pareja más idónea con el *Software Netprimer*.

2.15 Soporte informático.

Para el análisis de secuencias de ADN y aminoácidos se utilizó el programa: GeneJockey II. Dentro del conjunto de programas del NCBI (Nacional Center for Biotechnology Information) se utilizó el programa BLAST (Altschul, Madden et al. 1997) para comparar el grado de similitud de secuencias de ADN y de proteínas con secuencias presentes en las bases de datos.

2.16 Análisis por HPLC.

Para los análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de los caldos de cultivo procedente de las distintas cepas productoras de polienos, así como las extractos de reacción de amidación, fueron utilizadas la columna Kromasil C8 o Teknokroma TR-10003 C18 en fase reversa (10 x 4,6 mm) con una precolumna Phenomenex C8 (4 x 3 mm). Las fases móviles utilizadas en el gradiente binario de elución fueron; MetOH 100% (fase A) y NH₄Ac 20mM pH5, EtOH 20% (fase B), las condiciones de dicho gradiente se encuentran reflejadas en la Tabla 2.6. Los espectros de absorción y la detección de los distintos compuestos polienicos se llevaron a cabo mediante un detector de fotodiodo de array (Waters 996). La extracción de los datos de los cromatogramas se realizó a una absorbancia de 304nm.

	Flujo (ml/min)	%A	%B	Curva
	0.70	0.0	100.0	
2.00	0.70	0.0	100.0	6
4.00	0.70	50.0	50.0	6
10.00	0.70	100.0	0.0	8
12.00	0.70	0.0	100.0	11

Tabla 2.6. Gradiente binario utilizado para el análisis por HPLC de polienos **A:** MetOH 100%. **B:** NH₄Ac 20mM pH5, EtOH 20%. La curva hace referencia al tipo de gradiente utilizado según especificaciones

Las muestras tomadas de cultivos líquidos y sólido fueron extraídas con metanol 100% a una concentración final del 66.6%; las muestras procedentes de las reacciones de amidación se llevaron a una concentración final de 50%, posteriormente se centrifugaron 10 min a 13000 r.p.m. (minicentrífuga Heraeus), utilizando el sobrenadante para el análisis por HPLC.

2.17 Purificación de tetraenos.

La purificación de los tetraenos producidos por *S. diastaticus* var. 108 y sus recombinantes genéticos *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B y *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B-pSM858 se llevó a cabo según el protocolo descrito por Seco (Seco, Fotso et al. 2005).

2.18 Análisis por espectroscopía de masas.

La espectroscopía de masas de impacto electrónico (EIMS) para los compuestos CE-108D y CE-108E fue realizada a 70 eV utilizando un espectrofotómetro con un filamento Varian MAT 731, con un sistema de calentamiento Varian 311A y un analizador AMD-402, estos ensayos fueron realizados en el Departamento de Química Orgánica y Biomolecular de la Universidad de Göttingen.

La determinación de la masa de los compuestos Rimocidina D y Rimocidina E se llevó a cabo por el Instituto Biomar S.A. de León. El equipo HPLC-MS utilizado fue un MS01: HPLC Agilent Serie 1100 acoplado a un detector de masas cuadrupolo simple Serie 1100, equipado con una fuente de ionización por electrospray debidamente calibrada.

2.19 Análisis de RMN de los compuestos polienos.

El análisis por RMN de los compuestos CE-108D y CE-108E fue realizado en el Departamento de Química Orgánica y Biomolecular de la Universidad de Göttingen, bajo la supervisión del Prof. Hartmut Laatsch. La determinación estructural de Rimocidina E fue realizada en el Instituto Biomar S.A (León, España).

2.20 Electroforesis de proteínas.

Se utilizaron geles de acrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Sambrook 1989) la visualización de proteínas se realizó con una solución de azul de Coomassie en ácido acético/metanol (Laemmli 1970). El marcador de pesos moleculares utilizado como control fue Precision plus proteinTM Dual Color Standard (Bio-Rad).

2.21 Purificación de proteína His-Tag.

Para la purificación del híbrido de amidotransferasa P1 con cola de histidinas se partió de micelio congelado de *Streptomyces lividans* TK21/pLEC304 con el que se inoculó, por triplicado, 50 ml de medio líquido SYM2. Tras 24 horas de incubación a 30°C y 250 r.p.m. se pararon los cultivos introduciéndolos en un baño agua/hielo, los cultivos se juntaron y centrifugaron a 7.000 r.p.m. (Centrifuga Sorval Rc6 plus, rotor SS34); durante 10 min a 4°C, se lavó con tampón de lavado (50mM NaCl, 50mM TES pH7,2 y glicerol 10%), y se centrifugó en las mismas condiciones. El sedimento se resuspendió en 10ml de tampón de lavado suplementado con PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride, de Sigma) a una concentración final 0.5mM. La lisis celular se llevó a cabo por sonicación utilizando un sonicador modelo LabSonic2000 con una punta LabSonic2000U, se realizaron 4 pulsos de 20 segundos a la máxima potencia y con una frecuencia de ciclo de 0,9 segundos con intervalos de 1 minuto para el enfriamiento de la muestra en agua/hielo. La muestra se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4°C. Al sobrenadante se le añadió β -mercaptoetanol (β -ME) e imidazol hasta una concentración 5mM, en estas condiciones la muestra se cargó en una columna empaquetada con 800 μ l de resina de afinidad de Ni (Novagen His Bind[®] Resin 69670 M00066082), previamente acondicionada mediante lavados con agua desionizada, cargada con una solución de NiSO₄ 50 mM y equilibrada con el tampón de sonicación. La columna fue lavada con 100 volúmenes de tampón de lavado (50mM NaCl, 50mM TES pH7,2 y glicerol 10%, 15mM imidazol, 5mM β -ME). El tampón de elución utilizado fue: 50mM NaCl, 50mM TES pH7,2, glicerol 10%, 0,35M imidazol, el eluido final de 1ml fue dializado frente a 500 ml de 50mM NaCl, 50mM TES pH7, 2, glicerol 10% y 5mM β -ME durante una hora.

2.22 Ensayos *in vitro* de actividad enzimática.

Los ensayos de amidación *in vitro* se realizaron según el protocolo descrito por E. Seco (Seco, Fotso et al. 2005) Los distintos polienos utilizados como sustratos fueron: Pimaricina (Calbiochem 527962) y los compuestos, Rimocidina, Rimocidina D, CE-108 y CE-108D, los cuales fueron obtenidos a partir del caldo de fermentación de la cepa *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B según el protocolo descrito en el Apartado 2.14 de Materiales y Métodos.

2.23 Ensayos de actividad biológica.

2.23.1 Antibiógramas.

Sobre placas de LB se añadió una cobertura de agar SNA con concentraciones adecuadas de esporas, para los hongos filamentosos *A. niger* y *P. chrysogenum*; o de células, para las levaduras *F. neoformans* e *I. orientalis*. Una vez solidificado el agar de cobertura se dispusieron en la superficie de este, discos de papel impregnados con distintas concentraciones de los distintos antibióticos a ensayar. Las placas se incubaron a 30°C para los hongos y a 37°C en el caso de las levaduras. El periodo de incubación varió en función de la velocidad de crecimiento de cada especie.

2.23.2 Determinación de concentraciones mínimas inhibitorias.

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias del 100% del crecimiento microbiano (CMI₁₀₀) se llevó a cabo mediante el método de microdilución estandarizado por el comité norteamericano de estándares de laboratorios clínicos (NCCLS). Los métodos utilizados fueron el M27-A (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997) para levaduras y M38-P (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998) para hongos filamentosos. El método se basa en la determinación del rango de concentraciones donde se encuentra la CMI capaz de inhibir completamente el 100% de crecimiento microbiano. Debido a la naturaleza de los compuestos ensayados, las diluciones se hicieron según las indicaciones para antibióticos insolubles en agua. El método mantiene estandarizado el medio de cultivo (RPMI), pH (6,9-7), inóculo, tiempo y temperatura (37°C) de incubación. Para la preparación de un preinóculo se hicieron diluciones de las distintas suspensiones celulares en NaCl al 0,82% hasta obtener una transmitancia entre 75-80% para levaduras, 78-82% para *Aspergillus* y 74-76% para *Penicillium*. Para el inóculo en placa se hicieron diluciones, 1/50 para los hongos filamentosos y 1/1000 para levaduras, de los preinóculos en medio RPMI. La lectura de las placas se realizó a las 24 horas en el caso de *I. orientalis* y *A. niger* y de 48 horas para *F. neoformans* y *P. chrysogenum*.

2.24 Ensayos de toxicidad hemolítica.

Para los ensayos de toxicidad hemolítica nos basamos en el método descrito por Gomez-Gomez (Gomez-Gomez, Blazquez et al. 1996) con una adaptación que nos permitió el uso de una menor cantidad de los compuestos a ensayar.

Los compuestos fueron pesados y resuspendidos en DMSO a una concentración stock de 5 nmoles/ μ l para los compuestos Rimocidina B, Rimocidina E y CE-108B, 20 nmoles/ μ l para CE-108E y 0,05 nmoles/ μ l para el control Anfotericina B.

Concentraciones crecientes de cada compuesto, por triplicado, fueron llevadas a un volumen final de 25 μ l en DMSO y mezclado con 125 μ l de sangre de caballo desfibrinada (Oxoid n° de catálogo: CR0050) al 2,5% en Buffer PSB pH: 7.0 (Roche n° de catalogo: 11666789001) en placas de 96 pocillos con fondo en “V”. Como control negativo (0% de hemólisis) se añadió sobre la dilución sanguínea 150 μ l de DMSO, y como control del 100% de hemólisis se realizó una dilución sanguínea al 2,5% en H₂O, a la que se le añadió 150 μ l de DMSO. Las placas se incubaron a 37°C durante 30 min, y posteriormente se centrifugaron a 3700 r.p.m. durante 10 minutos. Los sobrenadantes se trasvasaron a placas de 96 pocillos con fondo plano para determinar la absorbancia a 545nm.

3 RESULTADOS.

3.1 Análisis de la diversidad biosintética de macrólidos polienos en *S. diastaticus* var. 108.

S. diastaticus var. 108 es el productor natural de los compuestos antifúngicos de naturaleza poliénica, Rimocidina y CE-108. Ambos compuestos comparten una misma ruta biosintética, siendo en el primer paso, la elección de la unidad iniciadora de la cadena policétida donde se resuelve hacia que compuesto va dirigida la síntesis. Se trata pues de un inicio flexible donde se pone de manifiesto la diversidad biosintética de esta cepa. Esta diversidad en la ruta biosintética de macrólidos polienos en *S. diastaticus* var. 108 también queda patente en el análisis cromatográfico de su caldo de cultivo, donde además de los compuestos mayoritarios, correspondientes a los compuestos Rimocidina y CE-108, aparecen una serie de compuestos muy minoritarios con espectro característico de polienos.

3.1.1 Determinación de especificidad de la unidad iniciadora por módulo de carga heterólogo.

Esta diversidad biosintética expresada como una relajada especificidad de sustrato por parte de RimA, así como las del resto de PKSs del *cluster* de biosíntesis, capaces de reconocer las distintas cadenas en formación derivadas de las diferentes unidades de iniciación, hacen de esta cepa una herramienta útil para analizar la capacidad de módulos de carga exógenos para seleccionar del medio acetil-CoA y/o butiril-CoA como unidades iniciadoras en la biosíntesis de polienos. Para ello se procedió a la obtención de un mutante con el gen *rimA* deleccionado, para poder utilizarlo en expresiones heterólogas. En principio el mutante nos permitiría evitar las interferencias en los análisis de la selectividad de algunos módulos de carga en condiciones heterólogas.

3.1.1.1 Obtención de un lisógeno de *S. diastaticus* var. 108 no productor de polienos: Interrupción del gen *rimA*.

Como paso previo para la disrupción *in vivo* de *rimA* se procedió a la construcción de un fago derivado del fago PM1, con dos regiones internas del gen *rimA* (502 y 500), flanqueantes a la zona a deleccionar correspondiente al dominio KS (501). El fago PM1 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos) es un actinofago att⁻ que, a diferencia de los actinofagos att⁺ que poseen un sitio de integración en el cromosoma de *Streptomyces*, sólo se pueden integrar por recombinación homóloga a nivel de los fragmentos clonados.

Los fragmentos 502 y 500 internos al gen *rimA* se correspondientes a los fragmentos de 1.1 Kpb *SacI/SalI* y 1.3 Kpb *SalI/SacI* (coordenadas 10760-11881 pb y 12523-13882 pb de la secuencia AY442225, respectivamente), los cuales fueron rescatados de los plásmidos pSM502 y pSM500 (Sección 2.1 de Materiales y Métodos) como fragmentos *BglIII-HindIII* (1.1 Kpb) y *HindIII-XbaI* (1.2 Kpb) respectivamente. Estos fragmentos fueron clonados simultáneamente en los sitios de restricción *BglIII-XbaI* del vector pAGe-1 (Sección 2.1 Materiales y Métodos), en la misma orientación que presentan en el genoma, dando lugar al plásmido pLEC101. Ambos fragmentos, junto con el correspondiente al gen de resistencia a Eritromicina (*ermE*) fueron rescatados del clon resultante como un fragmento *BglIII-PstI* y clonados en el fago PM1, digerido con las mismas enzimas para dar lugar al fago PM1/pLEC101 (Figura3.1).

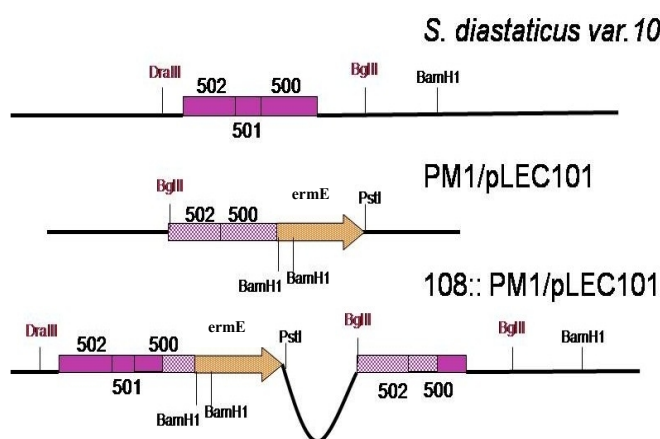


Figura3.1: Esquema de las construcciones usadas para generar la interrupción del gen *rimA*, y la inserción del fago PM1/pLEC101 en el genoma de *S. diastaticus* var. 108

La eficiencia de la infección en *S. diastaticus* var. 108 se aumentó mediante la infección con una suspensión de alto título del fago PM1/pLEC101, procedente de una infección previa en *S. lividans* TK21.

Tras la infección de *S. diastaticus* var. 108 con alto título del fago PM1/pLEC101, se obtuvieron 4 candidatos a posibles disruptantes, para los cuales se observaba liberación de fago mediante la presencia de placas de lisis. En el análisis mediante HPLC de sus caldos de cultivo se observó una drástica reducción en la producción de CE-108 y Rimocidina llegando a niveles residuales, sugiriendo con ello la obtención del disruptante en *rimA* de *S. diastaticus* var. 108.

La integración correcta del fago PM1-pLEC101 en los candidatos lisógenos fue confirmada por Southern blot (Apartado 2.11.1 de Materiales y Métodos), habiéndose obtenido así los recombinantes simples.

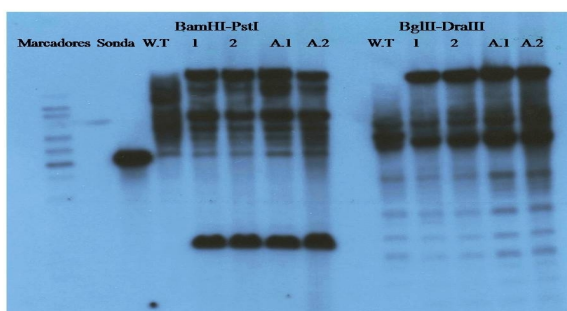


Figura 3.2: Southern blot confirmativo de la integración del fago PM1/pLEC101 por recombinación homóloga simple a nivel de los fragmentos 502 ó 500 internos al gen *rimA*.

Los fragmentos 502 y 500 se encuentran presentes en el genoma de *S. diastaticus* var. 108 separados por 0,7 kpb, esto nos podría permitir obtener un doble recombinante no productor, libre de fago, con el que se podría realizar nuevas manipulaciones genéticas para la obtención de una cepa con una mutación por delección del gen *rimA*.

3.1.1.2 Modificación del módulo de carga.

3.1.1.2.1 Expresión en condiciones heteróloga del módulo de carga *pimS0* en *S. diastaticus* var. 108.

La PKS de arranque para la biosíntesis de Pimaricina en su productor nativo *S. natalensis* está codificada por el gen *pimS0* (Aparicio, Colina et al. 1999). De los polienos descritos hasta el momento cuyo inicio de síntesis deriva de PimS0, se deduce que aparentemente esta PKS únicamente utiliza como unidad iniciadora acetil-CoA, ya que presentan una cadena lateral metilo en el carbono nº 25 (C₂₅) (Figura 3.3).

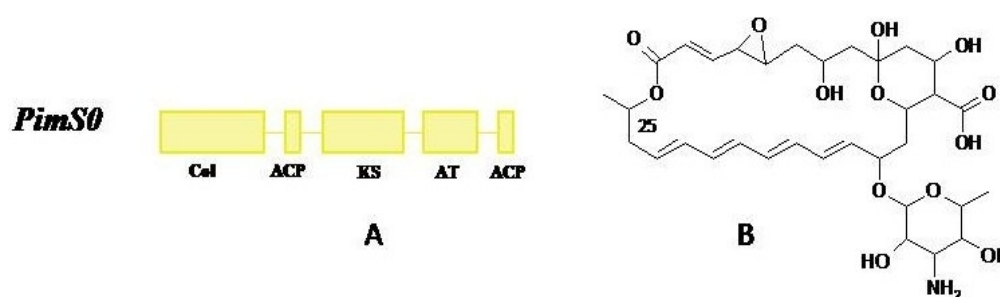


Figura 3.3: A) Esquema del módulo de carga PimS0. B) Estructura química del tetraeno Pimaricina.

El profesor Aparicio nos cedió el cósmido Cos 37, portador de un fragmento del cluster de biosíntesis de Pimaricina en *S. natalensis*. De este cósmido pudimos rescatar el módulo de carga de la ruta de Pimaricina como un fragmento *XmnI* de 6,9 Kpb, conteniendo en el

extremo 3' 431 pb hasta el ATG del gen *pimS0* y 1112 pb posteriores al codón de paro en el extremo 5'. El fragmento *XmnI* fue posteriormente clonado en el vector pIJ2925 y digerido como *HincII*, dando lugar al plásmido pCUE109 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos).

Para expresar *pimS0* bajo el promotor de eritromicina (*PermE**), clonamos el fragmento *SacI-EcoRI* de 5,9 Kpb procedente del plásmido pCUE109 en los sitios de restricción *EcoRI-SacI* del plásmido pSM780 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos), un derivado del vector bifuncional pHJL401, dando como resultado el plásmido pLEC108 (Figura 3.4).

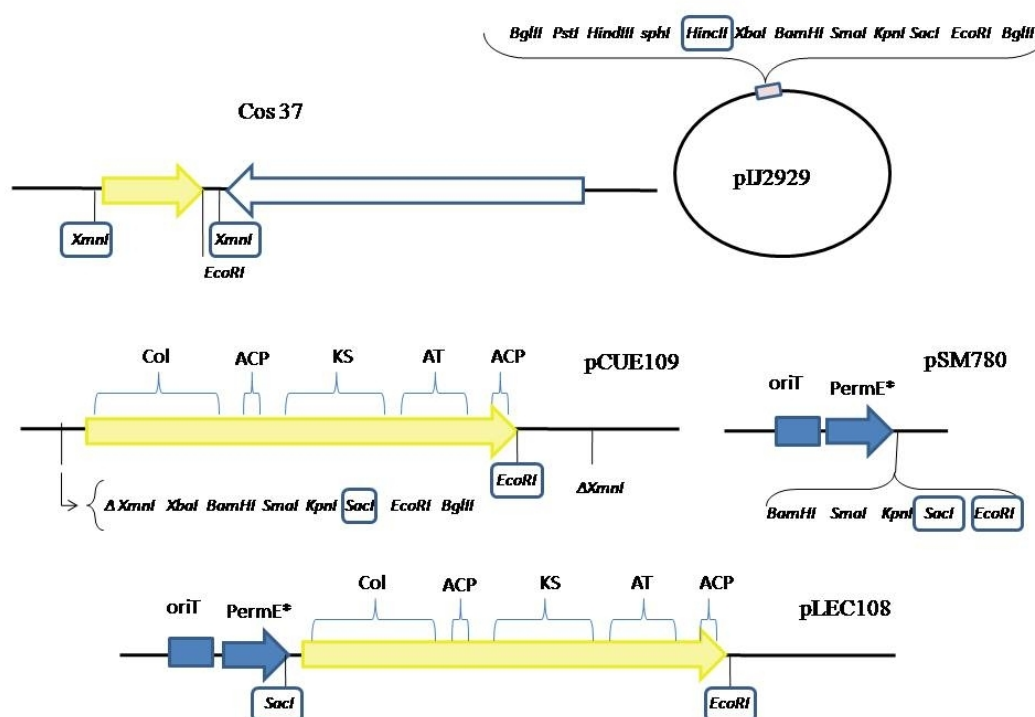


Figura 3.4: Esquema del proceso seguido para la construcción del pLEC108.

pLEC108 fue introducido en la cepa *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101 (disruptante en *rimA*) mediante transformación, según el protocolo descrito en la Sección 2.8.2 de Materiales y Métodos. A la cepa resultante se le dio el nombre de *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC108. La interrupción del gen *rimA* así como la presencia de los plásmidos fueron confirmados mediante Southern blot.

La capacidad de complementación de la PKS heteróloga PimS0 en el disruptante de *S. diastaticus* var. 108 fue analizada mediante HPLC en las condiciones cromatográficas descritas en la Sección 2.15 de Materiales y Métodos.

Los controles usados fueron los transformantes de *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101 conteniendo los plásmidos pSM780 y pSM783 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos). El plásmido pSM780 porta el promotor *Perme** en el vector pHJL401 y pSM783 incorpora el gen *rimA* bajo el control del promotor *Perme** en el vector pHJL401. El caldo de cultivo procedente del recombinante *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pSM783 fue analizado mediante HPLC detectándose el restablecimiento de la producción de los tetraenos Rimocidina y CE-108 (control positivo de complementación). En el caso de los transformantes *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pSM780 no se observó el restablecimiento en la producción de polienos (control negativo de complementación) (Figura 3.8).

En el análisis cromatográfico del caldo de cultivo de *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC108 (con el módulo de arranque heterólogo *pimS0*), se detectó la presencia de un único pico mayoritario con espectro característico de macrólidos tetraenos, cuyo tiempo de retención coincidía con el del compuesto CE-108 (Figura 3.8). Sin embargo, no se apreció la síntesis del compuesto Rimocidina.

En base a esto podemos decir que el módulo de carga *PimS0*, toma como unidad iniciadora para la biosíntesis de polienos acetyl-CoA y no puede iniciar la síntesis de una cadena policetónica a partir de butiril-CoA pese a que se lo permita el contexto genético en el que se esté expresando, como es el caso de *S. diastaticus* var. 108.

3.1.1.2.2 Obtención de Módulos de carga híbridos: *RimA-NysA*.

El gen *nysA* codifica la PKS que contiene el módulo de arranque para la biosíntesis de Nistatina en su productor natural *S. noursei* donde es capaz de discriminar fundamentalmente acetyl-CoA como unidad iniciadora. El resultado de la incorporación de acetyl-CoA como unidad iniciadora proporciona al anillo macrocíclico de Nistatina una cadena lateral metilo en el C₃₇ (Figura 3.5), al igual que ocurre en Pimaricina (C₂₅) y CE-108 (C₂₇).

En trabajos anteriores fue objeto de estudio la posible complementación heteróloga por parte del gen *nysA*, del disruptante en *rimA* de *S. diastaticus* var. 108. La cepa objeto de estudio *S. diastaticus* var. 108::PM1-500/767 contenía una interrupción en el gen nativo *rimA* y la presencia del gen *nysA* en un vector de bajo número de copias. El análisis mediante HPLC del caldo de cultivo de esta cepa reveló la incapacidad de NysA para complementar al disruptante en *rimA* (comunicación personal E. Seco).

Ante la incapacidad de *nysA* de complementar el disruptante en *rimA* nos propusimos hacer híbridos entre las PKS RimA y NysA, con el fin de identificar los posibles dominios de *nysA* capaces de complementar la disrupción de *rimA*. Las construcciones se diseñaron de forma que los recombinantes resultantes presentaran los dominios CoL (ácido carboxílico: CoA ligasa) y ACP de RimA, los cuales se encuentran ausentes en NysA (Figura 3.5). Estos dominios también están presentes en el módulo de carga PimS0, para el que si hemos observado complementación en la cepa con *rimA* interrumpido, es por ello que consideramos la necesidad de dichos módulos para la complementación del disruptante *rimA* en *S. diastaticus* var. 108.

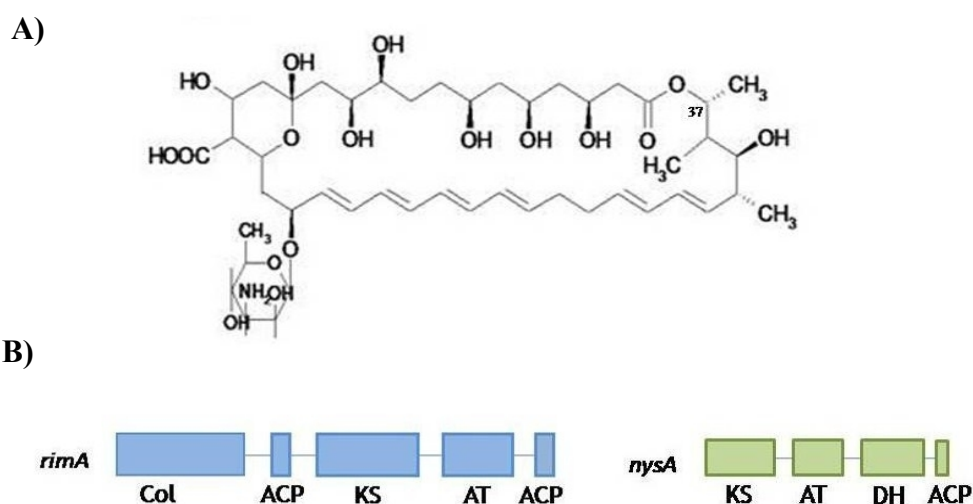


Figura 3.5: A) Estructura química del tetraeno Nistatina. B) Esquema de los módulos de carga *rimA* y *nysA* con los dominios catalíticos correspondientes.

Propusimos 3 modelos de PKSs híbridas (Figura 3.6):

1. **Híbrido 1:** Este híbrido es el resultado de incorporar los dominios CoL y ACP procedentes de *rimA* en *nysA*.
2. **Híbrido 2:** Está constituido por los dominios CoL, ACP y KS procedentes de *rimA* y los AT, DH y ACP de *nysA*. Al incorporar el dominio AT de *nysA* presumiblemente debería incorporar como unidad iniciadora acetil-CoA, ya que este dominio es el responsable de tomar del medio la unidad iniciadora, y como hemos argumentado anteriormente según la estructura de Nistatina, este módulo solo toma acetil-CoA en su productor natural *S. noursei*.
3. **Híbrido 3:** Está constituido por los dominios CoL, ACP, KS y AT procedentes de *rimA* y los DH y ACP de *nysA*. En este caso al presentar el dominio AT de

rimA presumiblemente podría incorporar como unidad iniciadora tanto acetil-CoA como butiril-CoA, ya que RimA es capaz de iniciar la biosíntesis de los polienos CE-108 y Rimocidina.

Estos híbridos fueron cedidos por el profesor Zotchev de la Universidad de Trondheim (Noruega) expresados bajo el promotor *P_{nysA}* en los plásmidos pSOKNR-A, pSOKNR-C pSOKNR-D (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos) para los Híbridos 1, 2 y 3 respectivamente.

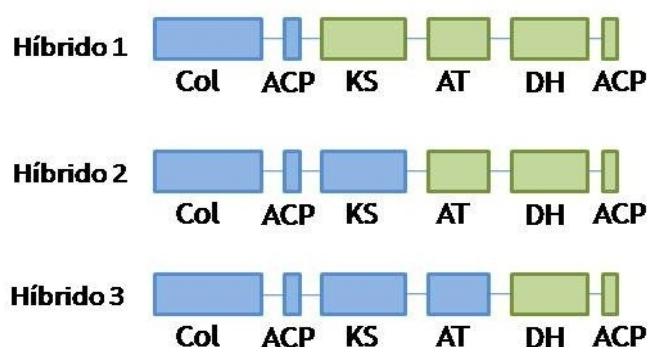


Figura 3.6: Esquemas de los módulos de carga híbridos *rimA-nysA*.

Para analizar la actividad de estos híbridos de PKS en el lisógeno de *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101 fue necesario expresarlos bajo el promotor de expresión constitutiva *PermE**. El vector replicativo pHJL401 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos) fue usado para la obtención de las construcciones definitivas.

Pese a numerosos intentos, no nos fue posible obtener la construcción para el Híbrido 1 que nos permitiese ver su expresión en *S. diastaticus* var. 108 Δ *rimA*. Los plásmidos pLEC104C y pLEC106D fueron las construcciones resultantes para los Híbridos 2 y 3 respectivamente, expresados bajo el promotor *PermE** en el vector pHJL401.

La construcción pLEC104C se obtuvo como resultado de la ligación conjunta de los fragmentos *NcoI-BglII* de 3.2 Kb procedente del plásmido pSOKNR-C y *BglII-XbaI* de 1 Kb procedente del plásmido pSM742 en el vector pSM783 liberado del fragmento *NcoI-XbaI* (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos) (Figura 3.7).

Para la construcción de pLEC106D se ligó el fragmento *NcoI* de 3,3 Kb procedente del plásmido pSOKNR-D en el plásmido pLEC104C liberado del fragmento *NcoI* de 3,2 Kb, se seleccionó la construcción en la que la ligación de los fragmentos se originó en la dirección que restablecía la secuencia del Híbrido 3 (Figura 3.7).

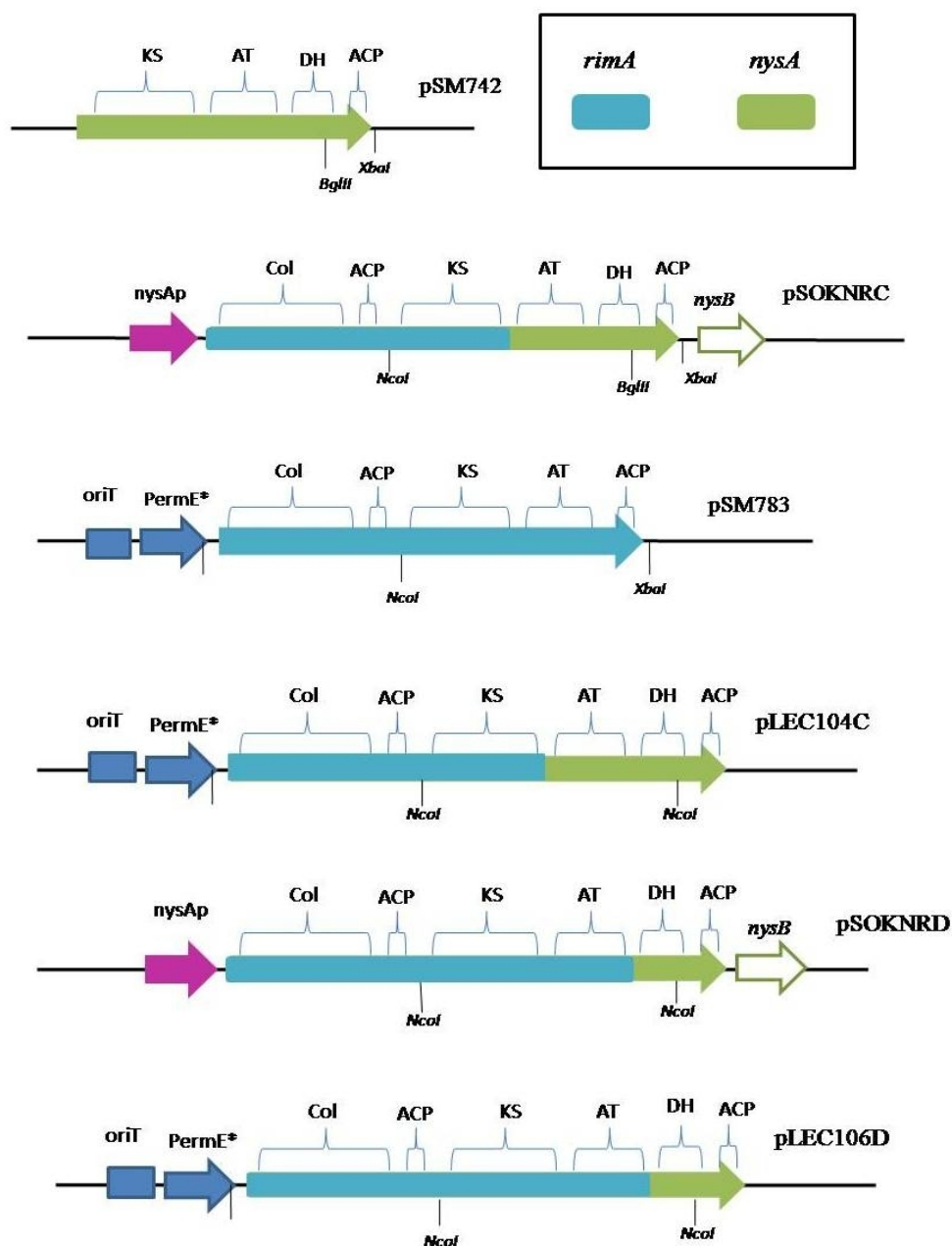


Figura 3.7: Esquema de las construcciones pLEC104C y pLEC106D.

La transformación de protoplastos de *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101 (Sección 2.8.2 de Materiales y Métodos) con el ADN de los plásmidos pLEC104C y pLEC106D procedentes de *E. coli* LH12567, permitió la obtención de las cepas recombinantes *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC104C y *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC106D.

La capacidad de complementación de las PKS híbridas *nysA-rimA* obtenidas, fue analizada mediante HPLC en las condiciones cromatográficas descritas en el Apartado 2.15

de Materiales y Métodos. Como controles de complementación de la interrupción de *rimA* nuevamente fueron utilizados los caldos de cultivo procedentes de las cepas: *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pSM783 y *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pSM780.

El recombinante *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC104C, cuya PKS híbrida posee el dominio AT procedente de *nysA*, presentó en su caldo de cultivo, según el análisis en HPLC, dos compuestos de producción mayoritaria con espectro típico de macrólido tetraeno cuyos tiempos de retención correspondían a los compuestos CE-108 y Rimocidina. (Figura 3.8).

Igualmente en el análisis mediante HPLC del caldo de cultivo del recombinante *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC106D, cuya PKS híbrida posee el dominio AT procedente de *rimA*, observamos el restablecimiento de la producción de polienos mediante la aparición de dos compuestos mayoritarios con iguales tiempos de retención a los de los compuestos CE-108 y Rimocidina. (Figura 3.8).

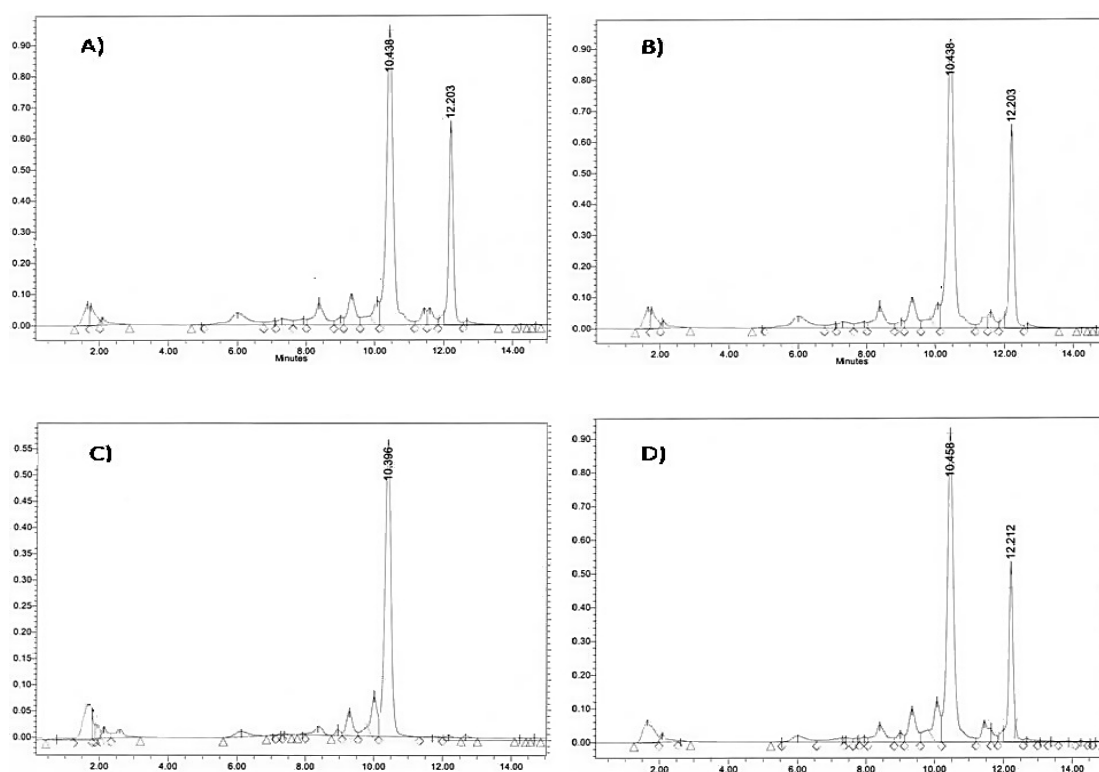


Figura 3.8 Producción de tetraenos derivada de la complementación del disruptante en *rimA*. A: *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC104C complementación con el módulo de carga híbrido *rimA-nysA* con AT de *nysA*. B: *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC106D complementación con el híbrido *rimA-nysA* con AT de *rimA*. C: 108::PM1/pLEC101-pLEC108, la complementación se debe al módulo de carga exógeno *PimS0*. D: *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pSM783, control positivo, complementado con el módulo de carga endógeno *rimA*.

Al contrario de lo que ocurre en la complementación del disruptante en *rimA* con *pimS0*, la complementación por parte de las PKSs híbridas *RimA-NysA* restablecen la producción tanto de CE-108 como de Rimocidina, cuyas estructuras químicas difieren en la cadena lateral que deriva del módulo de arranque. Por tanto, el dominio AT de NysA al igual que el dominio AT de RimA, puede tomar como unidad iniciadora acetil-CoA o butiril-CoA si el contexto genético donde se expresa se lo permite. Nos encontraríamos ante un módulo de carga con una especificidad relajada para el reconocimiento de unidades iniciadoras, que es expresado de forma natural en un contexto genético, el de *S. nousei*, más restrictivo que el de *S. diastaticus* var. 108, y que no le permite visualizar dicha flexibilidad.

3.1.2 Aumento cuantitativo en la heterogeneidad de producción en *S. diastaticus* var. 108.

Con el objeto de explotar la diversidad biosintética de la ruta de síntesis de macrólidos polienos en *S. diastaticus* var. 108 nos propusimos obtener recombinantes genéticos capaces de producir un aumento cuantitativo de aquellos compuestos que, con espectro característico de tetraenos, aparecen en el caldo de cultivo de esta cepa. Para ello contamos con el conocimiento de dos genes endógenos con influencia sobre la producción de tetraenos en esta cepa: *rimJ* y *pcsA*.

3.1.2.1 Interrupción en *rimJ*.

El gen *rimJ*, del *cluster* de biosíntesis de los macrólidos polienos Rimocidina y CE-108 en *S. diastaticus* var. 108, codifica para una crotonil-CoA reductasa (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004), una enzima que interviene en la formación de butiril-CoA a partir de acetil-CoA. De esta forma el sistema se provee de moléculas de butiril-CoA para iniciar la síntesis de Rimocidina, y de etilmalonil-CoA (mediante carboxilación de butiril-CoA) para la formación de la cadena lateral etilo en C₂, por parte del módulo de elongación n° 13, tanto en la síntesis de Rimocidina como de CE-108.

Con el objeto de disminuir la disponibilidad de ambas moléculas, butiril-CoA y etilmalonil-CoA, y ver su incidencia sobre la producción de polienos en *S. diastaticus* var. 108 nos dispusimos a realizar una interrupción *in vivo* del gen *rimJ* mediante la recombinación homóloga de un fragmento interno al gen, usando como vector un fago derivado del fago PMI (att).

Para la construcción el fago recombinante se ligaron, en los sitios de restricción *XhoI-SacI* del fago PMI, el fragmento *XhoI-BglIII* (1.8 Kpb) conteniendo el gen de resistencia a Eritromicina, procedente del plásmido pAGe, y un fragmento de 840pb interno a *rimJ* (coordenadas 16691-17530 pb de la secuencia AY442225) rescatado como *BamHI-SacI* del plásmido pER1, originándose el fago PMI-709B (Tabla 2.1 Materiales y Métodos).

La infección de *S. diastaticus* var. 108 se realizó a partir de una suspensión de alto título de fago PM1-709B, procedente de una infección en *S. lividans* TK21.

Tras la infección de *S. diastaticus* var. 108 con alto título del fago PM1-709B se obtuvo el lisógeno requerido para el estudio de un posible aumento cuantitativo en la producción de tetraenos minoritarios en *S. diastaticus* var. 108. La cepa resultante *S. diastaticus* var. 108::PM1-709B fue confirmada mediante *Southern blot*.

En los cromatogramas de los análisis del caldo de cultivo de *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B se observa cuatro compuestos mayoritarios; los enumerados como 1 y 2 se corresponden a los compuestos ya conocidos Rimocidina y CE-108 respectivamente, los picos cromatográficos 3 y 4 se corresponden con dos nuevos compuestos. Estos nuevos compuestos son producidos en la cepa silvestre en concentraciones muy minoritarias, sin embargo, la interrupción del gen *rimJ* favorece la síntesis de ambos compuestos a los que se les dio el nombre de Rimocidina D y CE-108 D (picos 3 y 4 respectivamente) (Figura 3.9).

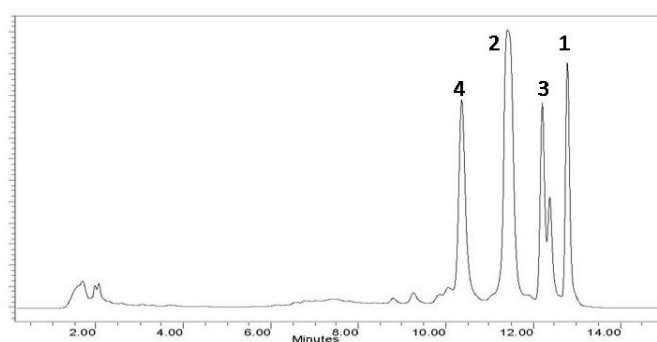


Figura 3.9: Producción de polienos en *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B:
1
Rimocidina, 2 CE-108, 3
Rimocidina D y 4 CE-108D.

El lisógeno con el gen *rimJ* interrumpido, *S. diastaticus* var. 108::PM1/709, presenta en su caldo de cultivo un compuesto ausente en la cepa silvestre, el cual presenta un tiempo de retención menor al de CE-108. (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004). Este compuesto coincide con el que hemos denominado CE-108D. Este mutante difiere del usado en este trabajo, *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B, en la resistencia del fago con el que se ha procedido a la interrupción del gen, cambiando de Tioestreptona (PM1-709) a Eritromicina (PM1-709B)

(Sección 2.1 de Materiales y Métodos). Las condiciones cromatográficas utilizadas anteriormente no permitieron observar la presencia del pico correspondiente al compuesto Rimocidina D, la sustitución de una columna Kromasil C8 por una de mayor resolución, Technokroma C18 nos ha permitido visualizar este nuevo producto biosintético y su posterior purificación.

3.1.2.2 Actividad amidotransferasa en la cepa *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B.

El gen *pcsA* (Seco, Miranzo et al. 2010) codifica para una amidotransferasa endógena, con una actividad “de adorno” que actúa sobre los tetraenos carboxilados producidos por *S. diastaticus* var. 108 dando lugar a sus correspondientes carboxiamidas (Figura 1.10 de Introducción). Esta actividad no es significativa en la cepa silvestre, por lo que los compuestos polienos amidados que derivan de su actividad *in vivo* aparecen en concentraciones residuales, prácticamente inapreciables en el análisis por HPLC.

Presumiblemente los compuestos Rimocidina D y CE-108D, cuyo incremento de producción deriva de la interrupción del gen *rimJ*, son tetraenos carboxilados, al igual que los otros dos compuestos producidos por este lisógeno, Rimocidina y CE-108, de este modo los nuevos compuestos podrían ser sustratos de la actividad amidotransferasa PcsA. Con el objeto de ampliar la heterogeneidad productiva de *S. diastaticus* var. 108 nos dispusimos a obtener un doble mutante donde la expresión constitutiva de la amidotransferasa PcsA y la sobreproducción de los compuestos Rimocidina D y CE-108D coexistieran. Para ello procedimos a transformar protoplastos del lisógeno *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B con el plásmido pSM858 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos). Al producir la cepa receptora altos niveles de Rimocidina D y CE-108D, tras la introducción del vector pSM858, portador del gen *pcsA* bajo el promotor *PerME**, cabría esperar la producción en concentraciones detectables de compuestos amidados derivados de Rimocidina D y CE-108D.

Los transformantes fueron seleccionados con Eritromicina, para mantener la interrupción con el fago, y con Tioestreptona para la selección de los recombinantes con el plásmido pSM858, y por tanto con una expresión constitutiva del gen *pcsA*.

El análisis mediante HPLC del caldo de cultivo del doble recombinante mostró un notable incremento en la variedad de polienos sintetizados. Además de los cuatro compuestos presentes en el lisógeno 108::PM1/709B (CE-108, CE-108D, Rimocidina y Rimocidina D), aparecen otros cuatro compuestos. Los picos 5 y 7 corresponden a los compuestos ya caracterizados CE-108B y Rimocidina B. A los nuevos compuestos

correspondientes a los picos 6 y 8, cuyos espectros también son los característicos de compuestos tetraenos, se les dieron los nombres de Rimocidina E y CE-108 E respectivamente (Figura 3.10).

Con estas modificaciones genéticas hemos obtenido a partir de *S. diastaticus* var. 108, una cepa de suelo productora únicamente de Rimocidina y CE-108, recombinantes genéticos productores de un amplio abanico de compuestos en cantidades significativamente altas.

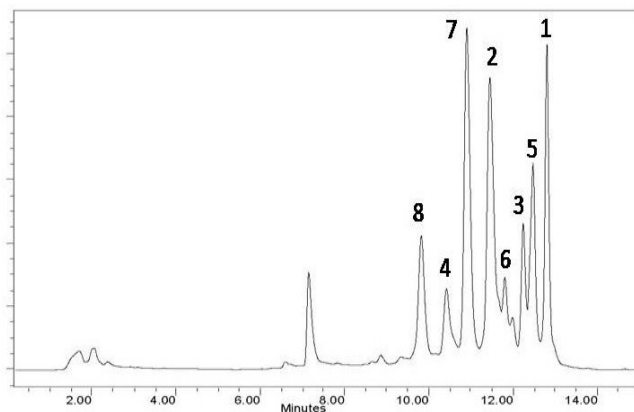


Figura 3.10: Producción de polienos en *S. diastaticus* 108::PM1/709-pSM858 donde 1 corresponde a Rimocidina, 2 a CE-108, 3 a Rimocidina D y 4 a CE-108D, 5 a Rimocidina B y 7 a CE-108B. Los nuevos compuestos Rimocidina E y CE-108E se corresponden con los picos 6 y 8 respectivamente.

3.2 Análisis y caracterización de los tetraenos CE-108D, CE-108E, Rimocidina D y Rimocidina E.

La obtención del doble mutante, *S. diastaticus* var.108::PM1/709B-pSM858, con una interrupción del gen *rimJ*, que disminuye la disponibilidad de moléculas de butiril-CoA y etilmalonil-CoA y la expresión constitutiva de la actividad amidotransferasa, capaz de producir modificaciones “de adorno” en los tetraenos carboxilados, nos ha permitido la purificación de los tetraenos Rimocidina D, Rimocidina E, CE-108D y CE-108E, para su posterior análisis y caracterización.

3.2.1 Purificación de los compuestos minoritarios a partir de *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B-pSM858.

Con el objeto de realizar los análisis de caracterización de los compuestos Rimocidina D, Rimocidina E, CE-108D y CE-108E, se llevó a cabo la purificación de estos nuevos tetraenos a partir de cultivos del recombinante *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B-pSM858 en donde sus niveles de producción son altos.

Para la purificación se partió de extractos metanólicos de los cultivos en medio sólido de la cepa *S. diastaticus* var. 108::PM1/709-pSM858, tal como se indica en Materiales y Métodos. En el proceso de purificación distinguimos dos pasos fundamentales: en un primer paso los extractos de metanol se hicieron pasar por una columna de intercambio iónico SP Sepharosa, obteniéndose así 2 fracciones; una con los compuestos carboxilados (fracción no retenida en la columna) y otra, que queda retenida en la columna, con los tetraenos amidados; en un segundo paso, los compuestos retenidos en la columna de SP fueron eluidos de la columna con Acetato Amónico 0.3M. Las fracciones eluidas se analizaron por HPLC para identificar aquellas conteniendo los compuestos de interés la cuales posteriormente se mezclaron. La mezcla fue desalada por extracción en fase sólida y los distintos compuestos se separaron por HPLC utilizando una columna Kromasil. Este proceso se realizó de forma reiterativa para obtener cantidades suficientes para realizar los distintos ensayos. Las condiciones para cada columna son descritas en la Sección 2.16 de Materiales y Métodos.

La pureza calculada por HPLC para cada uno de los compuestos se encuentra entre el 90-95%.

3.2.2 Determinación de estructuras químicas.

3.2.2.1 Análisis por HPLC-MS.

Tras haber sido purificados, los compuestos CE-108D, CE-108E, Rimocidina D y Rimocidina E fueron sometidos a un análisis de espectroscopía de masas, en las condiciones descritas en el Apartado 2.17 de Materiales y Métodos. Los pesos moleculares revelados mediante este análisis son presentados en la Tabla 3.1.

Tetraeno	[M+H ⁺]	Masa	[M+Na ⁺]
CE-108D	726	725	748
CE-108E	725	724	747
Rimocidina D	754	753	776
Rimocidina E	753	752	775

Tabla 3.1: Masas determinadas mediante HPLC-MS para los compuestos CE-108D, CE-108E, Rimocidina D y Rimocidina E.

3.2.2.2 Estructuras químicas de los compuestos CE-108D y CE-108E.

La determinación mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de las estructuras químicas de los compuestos CE-108D y CE-108E fue llevada a cabo en el laboratorio de Hartmut Laatsch de la Universidad de Göttingen, Alemania.

Las estructuras revelan que el compuesto de CE-108E es la correspondiente amida del compuesto CE-108D, poniéndose de manifiesto la actividad *in vivo* del producto de *pcsA* sobre CE-108D.

Los tetraenos CE-108 y CE-108B, así como los nuevos compuestos presentan un anillo macrocíclico común que confirma la sospecha de una procedencia biosintética común. Sin embargo las estructuras revelan una diferencia por parejas de compuestos (carboxilado y su correspondiente amidado) en la cadena lateral del carbono n° 2 (C₂), de tal forma que CE-108 y CE-108B presentan un grupo etilo, mientras que los nuevos compuestos, CE-108D y CE-108E, presentan un grupo metilo (Figura 3.11).

Según el modelo propuesto para la biosíntesis de CE-108 y Rimocidina (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004) esta cadena lateral deriva del módulo de elongación número 13, de tal forma que el grupo etilo se originaría al incorporar en este paso de la biosíntesis de la cadena

policetónica una molécula etilmalonil-CoA y el grupo metilo como consecuencia de la incorporación una molécula metilmalonil-CoA. Ante la menor disponibilidad de unidades etilmalonil-CoA producidas por la interrupción del gen *rimJ* (Sección 1.6 de Introducción), *S. diastaticus* var. 108 es capaz de utilizar como unidad elongadora metilmalonil-CoA, aumentando la producción de CE.108D y CE-108E, poniéndose nuevamente de manifiesto la versatilidad del *cluster* de biosíntesis de tetraenos en esta cepa, capaz de tomar dos unidades elongadoras diferentes en un mismo ciclo de elongación de la biosíntesis de la cadena policetónica.

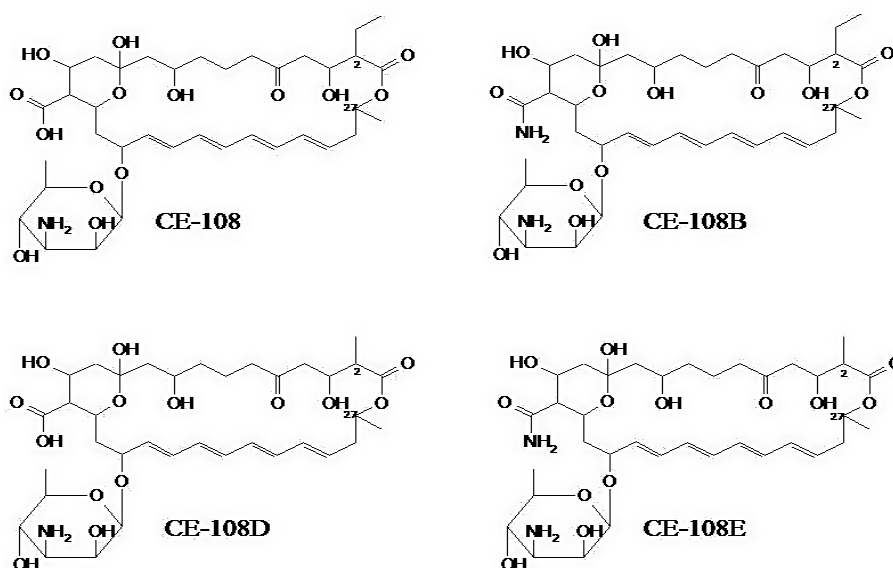


Figura 3.11: Estructuras químicas determinadas por RMN para los compuestos CE-108, CE-108B, CE-108D y CE-108E.

3.2.2.3 Estructuras químicas de los compuestos Rimocidina D y Rimocidina E.

La determinación mediante resonancia magnética nuclear (RMN) de las estructuras químicas del compuesto Rimocidina E fue llevada a cabo en el Instituto Biomar S.A. de León, España.

El análisis mediante RMN reveló que Rimocidina E mantiene el anillo macrocíclico presente en el resto de tetraenos producidos por *S. diastaticus* var. 108 y sus recombinantes genéticos, deduciéndose así una procedencia biosintética común.

En la Figura 3.12 se representa la estructura determinada por RMN para Rimocidina E. En ella observamos la presencia de un grupo amida exocíclico en lugar del carboxilo, por lo tanto, se trata de un compuesto amidado, presumiblemente consecuencia de la actividad *in vivo* de PcsA. También se observa un grupo etilo en la cadena lateral de C₂,

la misma que presentan los compuestos Rimocidina, Rimocidina B, CE-108 y CE-108B. Sin embargo, difiere de todos ellos en la naturaleza de la cadena lateral del C₂₇, presentando un grupo etilo, en lugar del metilo ó propilo característicos de CE-108/CE-108B y Rimocidina /Rimocidina B respectivamente.

Este nuevo compuesto, Rimocidina E, se generaría *in vivo* al iniciar la biosíntesis con propionil-CoA, lo que pone de manifiesto que RimA no sólo es capaz de iniciar la biosíntesis de polienos con butiril-CoA y acetil-CoA, sino que también es capaz de incorporar como unidad iniciadora moléculas de propionil-CoA, dando lugar a una cadena lateral exocíclica etilo en C₂₇.

Hasta el momento no se ha podido llevar a cabo los ensayos de RMN que determinen la estructura química de Rimocidina D, sin embargo consideramos a Rimocidina D (Figura 3.12) como el tetraeno carboxilado del cual deriva Rimocidina E, para dicha consideración nos basamos en los siguientes datos:

-Pesos moleculares de 753 y 754 para Rimocidina D y Rimocidina E respectivamente, con una diferencia de masa correspondiente a la sustitución de un grupo carboxilo por una amida.

-La confirmación a través de las estructuras de CE-108D y CE-108E de la capacidad de la actividad *in vivo* de PcsA para amidar otros polienos derivados de Rimocidina/CE-108 en *S. diastaticus* var. 108::PM1/709B-pSM858.

-La amidación *in vitro* por parte de PcsA de Rimocidina D dando lugar a un compuesto con el mismo tiempo de retención que Rimocidina E.

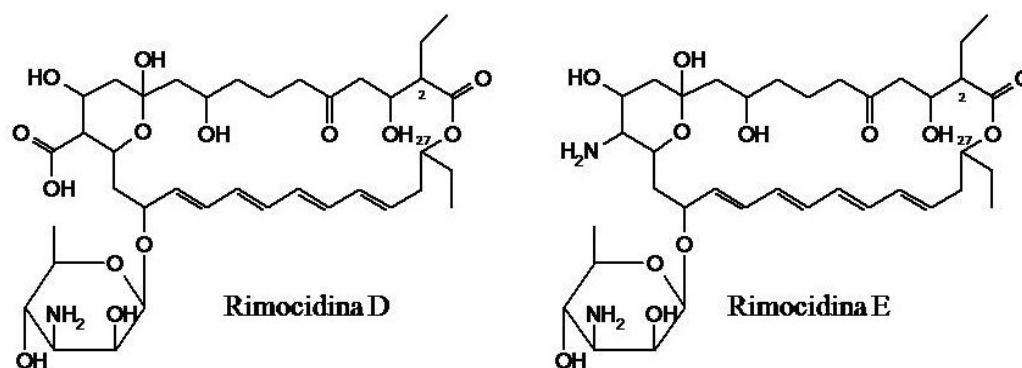


Figura 3.12: Estructura química estimada para Rimocidina D y estructura química determinada mediante RMN para Rimocidina E.

3.2.3 Análisis de actividad antifúngica.

Una vez purificados los compuestos CE-108D, CE-108E, Rimocidina D y Rimocidina E quisimos determinar si éstos presentaban una actividad antibiótica al igual que el resto de tetraenos producidos por *S. diastaticus* var. 108.

La capacidad biocida de los compuestos CE-108D, CE-108E, Rimocidina D y Rimocidina E fue analizada frente a dos cepas de levaduras: *I. orientalis* y *F. neoformans* y dos cepas de hongos filamentosos: *A. niger* y *P. chrysogenum*.

3.2.3.1 Antibiógramas.

En primer lugar se hizo una aproximación de la actividad de estos compuestos mediante la difusión de los compuestos en agar por medio de discos según lo descrito en Materiales y Métodos (Datos no mostrados).

La reducida actividad de los tetraenos CE.108D y Rimocidina D detectada mediante estos ensayos, nos llevó a descartar estos compuestos para ensayos de actividad posteriores.

3.2.3.2 Determinación de la CMI₁₀₀.

Puesto que los resultados obtenidos a través de los ensayos de difusión en discos pueden presentarse sesgados debido a la naturaleza anfipática de los polienos, cuya difusión se encuentra limitada en placas de agar, decidimos realizar ensayos de actividad antibiótica que nos proporcionaran una información más concreta y fiable que la derivada de los antibiógramas. Así pues procedimos al cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias del total del crecimiento (CMI₁₀₀) siguiendo protocolos estandarizados.

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias se llevó a cabo mediante el método de microdilución para levaduras (M27-A) y para hongos filamentosos (M38-P) descritos en la Sección 2.22.2 de Materiales y Métodos. Este método determina el rango de concentraciones dentro del cual se encuentra la concentración mínima inhibitoria del 100% del crecimiento microbiano. Los datos de las concentraciones mínimas y máximas que acotan el rango donde se encuentra la CMI₁₀₀ para los antibióticos Rimocidina, Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108, CE-108B, CE-108E y el fármaco de referencia Anfotericina B frente a las distintas cepas se encuentran reflejados en las Tablas 3.2 y 3.3.

	<i>I. orientalis</i>		<i>F. neoformans</i>	
	Concentración mín. (μ M)	Concentración máx. (μ M)	Concentración mín. (μ M)	Concentración máx. (μ M)
Anfotericina B	0.17	0.34	0.17	0.34
Rimocidina	6.52	13.04	3.26	6.52
Rimocidina B	3.26	6.52	1.63	3.26
Rimocidina E	6.65	13.3	3.32	6.65
CE-108	>81.19	>81.19	>81.19	>81.19
CE-108B	6.77	13.55	3.39	6.77
CE-108E	20.72	41.44	10.36	20.72

Tabla 3.2: Valores mínimos y máximo del rango de concentración donde se encuentran las CMI₁₀₀ para los compuestos Anfotericina B, Rimocidina, Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108, CE-108B y CE-108E frente a *I. orientalis* y *F. neoformans*.

	<i>A. niger</i>		<i>P. chrysogenum</i>	
	Concentración mín. (μ M)	Concentración máx. (μ M)	Concentración mín. (μ M)	Concentración máx. (μ M)
Anfotericina B	0.34	0.68	0.68	1.35
Rimocidina	3.26	6.52	3.26	6.52
Rimocidina B	1.63	3.26	1.63	3.26
Rimocidina E	6.65	13.3	3.32	6.65
CE-108	>81.19	>81.19	40.59	>81.19
CE-108B	13.55	27.10	3.39	6.77
CE-108E	41.44	82.87	41.43	82.87

Tabla 3.3: Valores mínimos y máximo del rango de concentración donde se encuentran las CMI₁₀₀ para los compuestos Anfotericina B, Rimocidina, Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108, CE-108B y CE-108E frente a *A. niger* y *P. chrysogenum*.

El análisis de los resultados nos permite concluir que, existe un aumento de la actividad antifúngica derivado de la sustitución del carboxilo exocíclico por un grupo amida (el rango donde se encuentra la CMI₁₀₀ de Rimocidina es mayor que el rango donde se encuentra la

CMI₁₀₀ de Rimocidina B, igualmente el rango donde se encuentra la CMI₁₀₀ de CE-108 es mayor que el rango donde se encuentra la CMI₁₀₀ de CE-108B).

Además si reparamos en los resultados de compuestos carboxilados por un lado y los derivados amidados por otro, evitando así el efecto producido por la amidación, vemos cómo la reducción en el número de carbonos en las cadenas laterales C₂ y C₂₇ conlleva una disminución de la actividad antifúngica (Figura 3.13). Es destacable el hecho de que la disminución en el número de carbonos de la cadena lateral del C₂₇ derivada de la sustitución de un grupo etilo (Rimocidina E) por un grupo metilo (CE-108B), no produce cambios de los valores que acotan sus CMI₁₀₀ frente a *I. orientalis*, *F. neoformans* y *P. chrysogenum*.

Finalmente podemos observar que el rango de concentraciones donde se encuentra la CMI₁₀₀ del fármaco de referencia Anfotericina B, es menor a cualquiera de los rangos donde se encuentran las CMI₁₀₀ de los diferentes tetraenos ensayados. Sin embargo, y debido a la alta toxicidad presentada por Anfotericina B, es necesario realizar ensayos de toxicidad para sacar conclusiones sobre estos nuevos tetraenos.

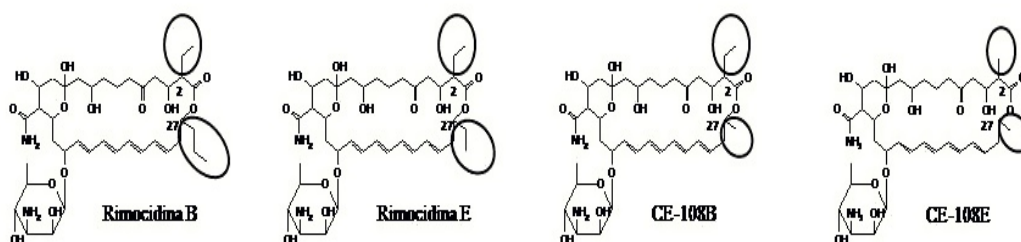


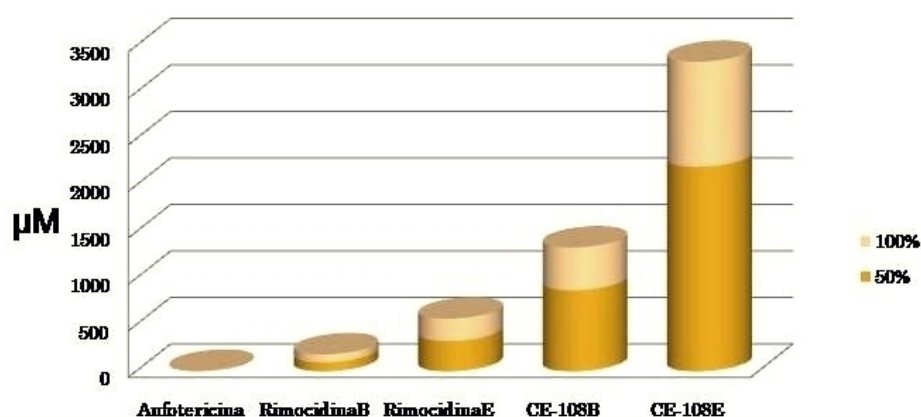
Figura 3.13: Estructuras químicas de los compuesto Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E, resaltando la disminución en el n° de carbono de las cadenas laterales de C₂ y C₂₇.

3.2.4 Análisis de la actividad hemolítica.

Con el objeto de determinar si los nuevos tetraenos presentan alguna ventaja frente al fármaco de referencia Anfotericina B, en términos de toxicidad, realizamos ensayos de actividad hemolítica frente a sangre de caballo, según lo descrito en la Sección 2.23 de Materiales y Métodos.

Los ensayos de hemólisis se realizaron únicamente para los compuestos amidados ya que parece no existir diferencias significativas entre la actividad hemolítica de un polieno carboxilado y su correspondiente amida (Seco, Cuesta et al. 2005).

En la Figura 3.14 se representan las concentraciones expresadas en μM de los tetraenos Anfotericina B, Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E, que producen el 50% y 100 % de hemólisis. Vemos como la disminución de la toxicidad está estrechamente relacionada con la disminución en el número de carbonos de las cadenas laterales de los carbonos C_2 y C_{27} .



	50%	Desviación 50%	100%	Desviación 100%
Anfotericina B	3	0,13	6	0,2
RimocidinaB	96,6	6,6	183	4
Rimocidina E	326	0,13	566	0
CE-108 B	873	33,3	1333	4
CE-108 E	2200	126	3330	40

Figura 3.14: Concentraciones (μM) de los compuestos Anfotericina B, Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E, que producen el 50% y 100 % de hemólisis.

Podemos ver como los nuevos compuestos ensayados presentan valores de toxicidad significativamente inferior a los correspondientes al fármaco de referencia Anfotericina B.

3.2.5 Correlación entre los resultados de actividad antifúngica y toxicidad.

Para poder obtener conclusiones sobre las posibilidades que presentan los compuestos Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E, como futuros fármacos se hace necesario correlacionar los resultados obtenidos en los ensayos de actividad y toxicidad, haciendo referencia al fármaco de elección en el tratamiento de infecciones fúngicas, Anfotericina B.

Para facilitar este análisis presentamos en la Tabla 3.4 el número de veces que la Anfotericina B es más activa que los compuestos ensayados, expresándolo como el número de veces que habría que aumentar la cota superior del rango donde se encuentra la CMI₁₀₀ de Anfotericina B para igualar la cota máxima del rango donde se encuentra la CMI₁₀₀ de cada tetraeno para cada microorganismo. En la Tabla 3.5 se presenta el número de veces que hay que aumentar la dosis de cada compuesto con respecto a Anfotericina B para producir el 100% de hemólisis.

	<i>I. orientalis</i>	<i>F. neoformans</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. chrysogenum</i>
Rimocidina B	19.14	9.58	4.79	2.41
Rimocidina E	39.11	19.55	19.5	5.88
CE-108B	39.70	19.91	39.85	5.01
CE-108E	121.88	60.94	121.88	30.70

Tabla 3.4: Número de veces que Anfotericina B es más activa que los compuestos: Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E

Rimocidina B	30.5
Rimocidina E	96.93
CE-108B	222.1
CE-108E	555

Tabla 3.5: Número de veces que Anfotericina B es más tóxica que los compuestos. Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E

Para los cuatro compuestos: Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E, frente a todas las cepas testadas se cumple que el incremento en la dosis necesario para igualar el efecto antifúngico del fármaco de referencia (Anfotericina B) supone un aumento inferior al que sería necesario para igualar sus efectos tóxicos hasta el 100% de hemólisis.

Estos resultados resaltan las ventajas proporcionadas por la amidación del carbono exocíclico de los polienos, lo que nos ha animado a realizar algunos estudios sobre el gen responsable de la amidación en *S. diastaticus* var. 108, *pcsA*, y en *S. sp* RGU5.3, *pcsB*, con el objeto de poder trasladar estas ventajas a otros polienos heterólogos.

3.3 Actividad de adorno post-PKS: análisis de la amidación.

Las modificaciones de adorno ó post-PKS presentan frente a las modificaciones intra-PKS la ventaja técnica de permitir una mejor manipulación genética además de poder ser aplicadas a otros macrólidos polienos heterólogos *in vitro* o *in vivo*.

Para el caso particular de la amidación del grupo carboxilo exocíclico, ya sea por semisíntesis o *in vivo*, se ha demostrado que confiere a la molécula de importantes mejoras farmacológicas.

Trabajos previos en el laboratorio concluyeron con el aislamiento y caracterización de los genes responsables de la amidación *in vivo* del carboxilo exocíclico de los polienos nativos de *S. diastaticus* var.108 y *S. sp.*RGU5.3, a los que se les dio el nombre de *pcsA* y *pcsB* respectivamente (Miranzo, Seco et al. 2010 ; Seco, Miranzo et al.2010). Las proteínas para las que codifican, PcsA y PcsB, presentan una identidad de 86% y una alta homología con la familia de las asparragina sintasas. Las proteínas de esta familia presentan un dominio glutaminasa en el extremo N-terminal, responsable de la hidrólisis del grupo amido de la glutamina, y en el extremo C-terminal un dominio sintasa responsable de la amidación de los distintos sustratos (Figura 3.15).

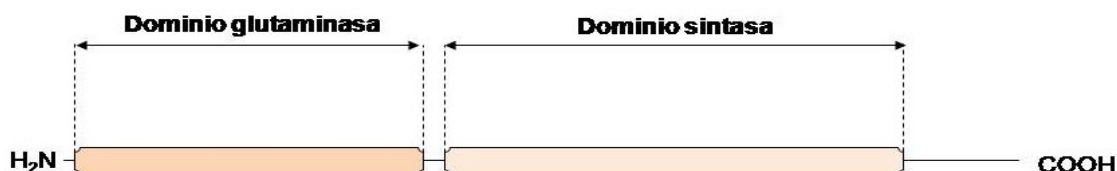


Figura 3.15: Esquema de los dominios catalíticos presentes en la familia de las asparragina sintasas.

3.3.1 Análisis de la especificidad de sustratos.

Las reacciones *in vitro* de las amidotransferasas PcsA y PcsB (procedente de *S. diastaticus* var. 108 y *S. sp* RGU5.3) frente a distintos sustratos polienos, han revelado diferencias en la especificidad hacia los mismos, de tal forma que PcsA reconoce tanto los tetraenos naturales de su cepa (Rimocidina, Rimocidina D, CE-108 y CE-108D), como el tetraeno heterólogo Pimaricina, mientras que PcsB presenta una especificidad más restringida, reconociendo únicamente el compuesto Pimaricina, cuya síntesis también es llevada a cabo en *S. sp* RGU5.3. (Miranzo, Seco et al. 2010; Seco, Miranzo et al. 2010). Esta diferencia en el reconocimiento de polienos por parte de las distintas amidotransferasas

supone una herramienta para la determinación de la secuencia de aminoácidos implicada en la especificidad de sustrato. Esto nos permitiría en un futuro realizar mutaciones dirigidas con el objeto de relajar más la especificidad de sustrato de PcsA poder amidar *in vivo* otros polienos carboxilados de interés industrial-farmacológico.

3.3.1.1 Híbridos *PcsA* y *PcsB*.

Con el objeto de determinar la parte de la proteína implicada en la relajación o restricción de la especificidad de sustrato se diseñaron 4 quimeras de amidotransferas a partir de PcsA y PcsB:

1. **Híbrido P1:** Presenta el dominio glutaminasa de PcsA y el dominio sintasa de PcsB.
2. **Híbrido P2:** Está constituido por el dominio glutaminasa de PcsB y el dominio sintasa de PcsA.
3. **Híbrido P3:** Posee el dominio glutaminasa completo y el dominio sintasa excepto el extremo C-terminal de PcsA que es sustituido por la secuencia homóloga de PcsB.
4. **Híbrido P4:** Posee los dominio glutaminasa y sintasa de PcsA salvo la secuencia comprendida entre los aminoácidos 383-510 (perteneciente al dominio sintasa) que se corresponde a PcsB.

Todos los híbridos fueron clonados bajo el promotor *Perme** en un vector con resistencia a Tioestreptona (pSM780 y pSM858) Sección 2.1 de Materiales y Métodos..

Para la construcción del híbrido P1 se rescataron el fragmento *HindIII-NarI* de 2Kb procedente del pSM858 (conteniendo el oriT, el promotor *Perme** y el dominio glutaminasa de PcsA) y el fragmento *NarI-EcoRI* de 1kb procedente del plásmido pDog45 (conteniendo el dominio sintasa de PcsB.) Ambos fragmentos fueron clonados en el plásmido pSM858 digerido con *HindIII-EcoRI* y liberado del fragmento de 3Kb (correspondiente a oriT, el promotor *Perme** y el dominio glutaminasa de PcsA), dando lugar al plásmido pLEC307 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos).

El híbrido P2 se obtuvo mediante la ligación simultánea del fragmento *NarI-EcoRI* de 1 Kb procedente del plásmido pSM858 (conteniendo el dominio sintasa de PcsA) y el fragmento *BglIII-NarI* de 750pb procedente de la amplificación por PCR de un fragmento

interno del plásmido pDog 35 (conteniendo el dominio glutaminasa de PcsB), en el vector pSM780 digerido con *BamHI-EcoRI*, originando el plásmido pLEC305 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos).

Para obtener el híbrido P3 se clonaron simultáneamente el fragmento *XmnI-EcoRI* de 350pb procedente del plásmido pDog 35 (correspondiente al extremo C-terminal de PcsB), y el fragmento *SacI-XmnI* de 380pb procedente del plásmido pSM858 (correspondiente al dominio sintasa de PcsA) en el vector pSM858 liberado del fragmento *SacI-EcoRI* de 755pb (correspondiente al extremo C-terminal de PcsA), originando el plásmido pLEC308 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos).

Para obtener el híbrido P4, se amplificó por PCR un fragmento interno del pLEC307 usando los oligos: AsnB-*SacI*(1147)uni. y AsnB-*XmnI*(1530).rev. (Sección 2.9.4 de Materiales y Métodos), originando un sitio de restricción *SacI* en el extremo 5'. El producto resultante de la amplificación fue clonado en un sitio *SmaI* del vector pUC19, dando lugar al plásmido pLEC113. El fragmento de 383pb (conteniendo la secuencia de nucleótidos del 1147 al 1530 de *pcsB*) rescatado como un fragmento *SacI-XmnI* del plásmido pLEC113, y el fragmento de 400pb *XmnI-EcoRI* procedente del plásmido pSM858 fueron clonados simultáneamente en los sitios de restricción *EcoRI-SacI* del vector pSM858 (liberado del fragmento de 783pb correspondientes al extremo C-terminal de PcsA). La construcción resultante fue el plásmido pLEC309 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos).

Las construcciones pLEC307, pLEC305, pLEC308 y pLEC309, señalando los sitios de restricción utilizados para su clonaje son mostrados en la Figura 3.16.

Análisis *in vitro* de la especificidad de sustrato de los híbridos PcsA y PcsB.

Para el análisis, mediante reacciones *in vitro*, de la capacidad de reconocimiento de los distintos híbridos para los distintos sustratos, llevamos a cabo la expresión de las quimeras en un sistema heterólogo como *S. lividans* TK21, evitándose así interferencias generadas por la presencia de los polienos nativos en los extractos acelulares. Se transformaron protoplastos de *S. lividans* TK21 con ADN de cada híbrido procedente de la cepa *E. coli* LH12567, obteniéndose las cepas: *S. lividans* TK21/pLEC307, *S. lividans* TK21/pLEC305, *S. lividans* TK21/pLEC308 y *S. lividans* TK21/pLEC309. La confirmación de la presencia de los diferentes híbridos en los distintos transformantes se realizó mediante la purificación de los plásmidos en los recombinantes según lo descrito en el Apartado 2.5.2 de Materiales y Métodos, y el posterior análisis por restricción.

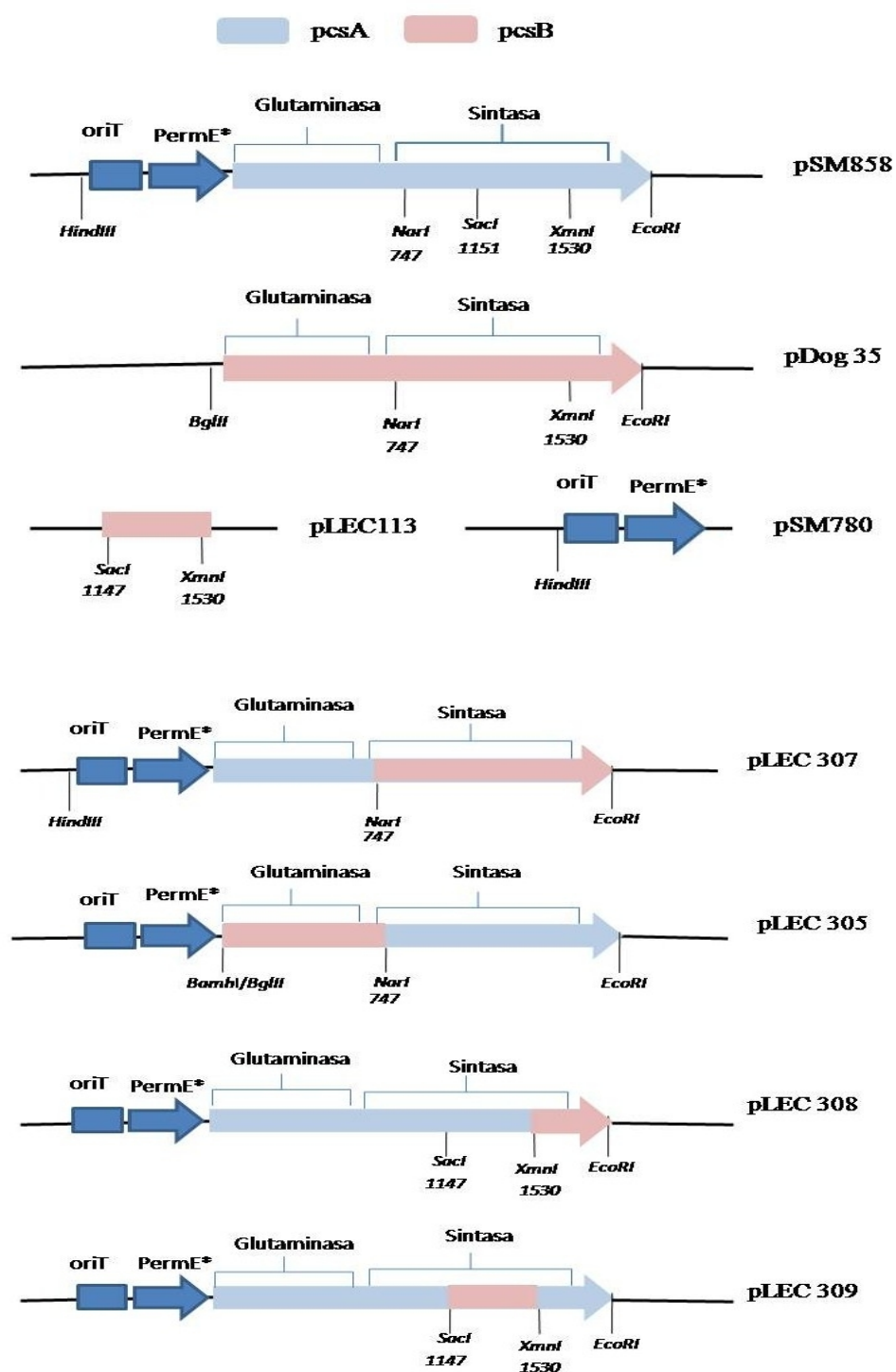


Figura 3.16: Construcciones de los plásmidos pLEC307, pLEC305, pLEC308 y pLEC309 con los fragmentos codificantes de los híbridos P1, P2, P3 y P4 respectivamente, indicando los sitios de restricción usados para sus clonajes, y la procedencia de cada dominio

Se realizaron reacciones de amidación *in vitro* en las condiciones descritas en el Apartado 2.21 de Materiales y Métodos a partir de los extractos acelulares de las distintas cepas. Los sustratos testados fueron CE-108 y Pimaricina. Los datos del porcentaje de amidación a las 16 horas del inicio de las reacciones se presentan en la Tabla 3.6.

Híbrido	Pimaricina	CE-108
P1	22.9%	ND*
P2	37.0%	79.0%
P3	25.5%	45.8%
P4	85.0%	54.4%

Tabla 3.6: Actividad de amidación de los extractos acelulares de las cepas *S. lividans* TK21/pLEC307, *S. lividans* TK21/pLEC305, *S. lividans* TK21/pLEC308 y *S. lividans* TK21/pLEC309, correspondientes a los Híbridos P1, P2, P3 y P4 respectivamente. La actividad *in vitro* de los Híbridos es expresada en % de conversión para los tetraenos sustratos, Pimaricina y CE-108. ND*: actividad no detectable.

Las reacciones de amidación *in vitro* revelaron la falta de reconocimiento del híbrido P1 por el polieno CE-108. Quisimos corroborar este resultado y además estudiar la especificidad de la enzima híbrida P1 hacia el resto de sustratos reconocidos por la proteína PcsA (CE-108D, Rimocidina y Rimocidina D). En este caso procedimos a realizar las reacciones de amidación desde extractos purificados. Para ello realizamos una construcción del híbrido P1 portando una cola de 6 residuos histidinas en el carboxilo terminal. Para la obtención del híbrido P1-His-tag se rescataron el fragmento *HindIII-NarI* de 2Kb procedente del pSM858 (conteniendo el oriT, el promotor *Perme** y el dominio glutaminasa de PcsA) y el fragmento *NarI-EcoRI* de 1kb procedente del plásmido pDog47 (conteniendo el dominio sintasa de PcsB.) Ambos fragmentos fueron clonados en el plásmido pSM858 digerido con *HindIII-EcoRI*, liberado del fragmento de 3Kb correspondiente a oriT, *Perme** y el dominio glutaminasa de PcsA. El producto resultante fue el plásmido pLEC304 (Tabla 2.1 de Materiales y Métodos). En el laboratorio se han realizado comprobaciones con las proteínas nativas PcsA y PcsB frente a sus homólogos con colas de histidinas, concluyéndose que las 6 histidinas no afectan a la actividad de las mismas.

El proceso de purificación a través de una resina de afinidad de níquel se encuentra detallado en el Apartado 2.20 de Materiales y Métodos. Las reacciones a partir de

extracto purificado, dieron lugar la conversión del 100% de Pimaricina en AB-400 en 3 horas. Para el resto de compuestos ensayados no se observaron indicios de amidación, corroborándose la falta de reconocimiento por parte del híbrido P1 hacia los tetraenos CE-108, CE-108D, Rimocidina y Rimocidina D.

Análisis de la relación secuencia-especificidad de sustrato.

La incapacidad del híbrido P1 para amidar los polienos nativos de *S. diastaticus* var. 108 nos indica que el cuello de botella para la especificidad de sustrato se encuentra en el dominio sintasa. Por lo general, es en este dominio donde se encuentran la mayor parte de las diferencias en la secuencia primaria de las distintas asparragina sintasas (Scofield, Lewis et al. 1990; Fresquet, Thoden et al. 2004; Ramos-Vega, Davila-Martinez et al. 2009), por lo que cabe esperar que algunos de estos residuos de aminoácidos sean los responsables de una especificidad de sustrato restrictiva en PcsB y más relajada en PcsA.

El hecho de que para un mismo tiempo de reacción y mismo extracto, y por tanto cantidad de proteína, la conversión de CE-108 sea mayor que la de Pimaricina con el Híbrido P2, y mayor para Pimaricina que para CE-108 con el Híbrido P4, nos permite acotar desde el aminoácido 382 al 510, como la región más estrechamente implicada en el reconocimiento de sustrato.

Un alineamiento de las secuencias de PcsA y PcsB nos muestra que dentro de la secuencia acotada por el análisis de la actividad de los Híbridos (aa del 382 al 510) existe una región interna comprendida entre los aa 410 y 455, donde se concentra el mayor número de residuos diferentes entre ambas proteínas. Por lo tanto, se podría pensar que en esta región se encuentran los residuos responsables de restricción o relajación en la especificidad de sustrato (Figura 3.17).

Igualmente el alineamiento de PcsA con otras proteínas de la familia de las asparraginas sintasa, con gran diversidad de sustratos, nos muestran la existencia de un menor grado de conservación en la secuencia de aminoácidos comprendida entre los residuo 390 y 460.

PcsA	MCGISGWLAFDRDLTKEQATVDAMTGT MAYRGPDAGGTWVDRHVALGHRRLAVIDIEGGT	60
PcsB	MCGISGWLAFD DLTKEQATVDAMT TMAYRGPD GTWVDRHVALGHRRLAVIDIEGGT	60
PcsA	QPMRVDTPNGPVAITYSGEVNFTELREELRRHGHRFTASDTEVVLRGYLQWGEALADR	120
PcsB	QPMRVDTPNGPV ITYSGE YNFTELREELRR GHRFRT+SDTEVV L YL+WGEA+ADR	120
PcsA	LNGMYAFAIWDSDRNEKLVMI RDRMGIKPFYFHPTADGVLF GSEPKAILAHPMFKRVIEAD	180
PcsB	LNGMYAFAIWD+R+EKLVMIRDRMGIKPFYFHPTADGVLF GSEPKAILAHPMFKRVI+A+	180
PcsA	GLFELLSVCKTPGHAIWSDMREV RPSLVVVDRAGLRERTYWKLTQEHTDDRD TTVTKI	240
PcsB	GLFELLSVCKTPG+AIWSDMREV RPSLVVVD R+G+RERTYWK L ++EHTDD DTT+ I	240
PcsA	RELLEDIVRRQLVADVPQC VLLSGGLDSSSITALSARELA AHGEKVR SFSVDFVGLADNF	300
PcsB	R+LL D VRRQLVADVPQC VLLSGGLDSSS+TAL+ARELAA GEKVR SFSVDF GLADNF	300
PcsA	RPDNMRATPDSFFVHDVADHVGSLHEDIVLPHTALTDPDARRAVLA AKDFPSGLADV DVS	360
PcsB	RPD+MRATPDSFFVHDVADHVGSLHEDIVLPHTALT DARRAV+AAKDFPSG+ADV DVS	360
PcsA	LYMLFKAI REHSTVALSGETADEL FGGYPWFQDPVAQRAGIFP WMPVLS EWSKANALGL	420
PcsB	LY LF AIREHSTVALSGETADEL FGGYPWF+DPVAQRAGIFW++PV+S W+KAN G	420
PcsA	LNPDLIAMS D LGTYVKDRYSEAVAGVEPLPGEDVQERRMRVMSHLHLTRFLQVLLDRKDR	480
PcsB	L+PDL+A + L TY+KDRYSEAVA VE LPGED ERMRVMSHLHLTRFLQ+LLDRKDR	480
PcsA	ISMAVGLEVRVPYCDHRLVEYVYNTPWAMK SFDGREKSLLR AAAGDLLPRSVVERLKSPY	540
PcsB	ISMAVGLEVRVPYCDHRLVEYVYNTPWAMK SFDGREKSLLR AAAGDLLPRSVVERLKSPY	540
PcsA	PSTQDPGYAGGLQQMGKQLLSEPDHPIFQLVTRASLDKMVKLDPAKMPDAIREQLDRMMD	600
PcsB	PSTQD YA GLQQMGKQLLSE DHPIFQ+VTR ++D+MVKLDPA MP REQLDRM+D	600
PcsA	IATWLEMYQPEIRMS	615
PcsB	IATWDMHQPDIRVA	615

Figura 3.17: Alineamiento de las secuencias PcsA y PcsB. En color gris se resalta la región comprendida entre los aminoácidos 382 y 510; en color rojo, la zona con menor similitud entre ambas secuencias (aminoácidos 410-455).

3.3.2 Amidación por estrés.

Como se ha reflejado en los antecedentes de este trabajo, *Streptomyces diastaticus* var.108 produce tetraenos amidados en una proporción muy minoritaria; mediante la

manipulación genética consistente en la transformación de protoplastos de la cepa silvestre con un plásmido derivado del SCP2* conteniendo el gen de resistencia a Eritromicina (Seco, Cuesta et al. 2005). Esto condujo a una sobreexpresión de los mismos, permitiendo la purificación y caracterización de los compuestos Rimocidina B y CE-108B. En el caso de la cepa *S. sp.* RGU 5.3 la síntesis del compuesto amidado AB-400, se produce de forma constitutiva en concentraciones similares al compuesto parental Pimaricina. Recientemente fueron caracterizados los genes responsables de la amidación en ambas cepas, llegándose a conocer que su localización cromosómica esta fuera del *cluster* de biosíntesis de polienos y próxima al operon *pho*, aún así se sigue sin saber los mecanismos que determinan la inducción de estos genes.

Quisimos someter a *S. diastaticus* var. 108 a distintas condiciones de estrés con el ánimo de conocer si en algunas de las condiciones se producía una inducción que modificara el patrón de producción de tetraenos a favor de los compuestos amidados. Las condiciones de estrés probadas fueron:

- Disminución de la oxigenación: Para la disminución de la oxigenación del cultivo optamos por un aumento en el volumen del medio de cultivo para un mismo matraz y velocidad de agitación (250 r.p.m.), pasando de 50 ml a 150 ml, en un matraz de 250 ml, y de 20 ml a 60 ml en un matraz de 100 ml. El análisis mediante HPLC de los distintos caldos de cultivo no mostraba diferencias con respecto a los controles.
- Concentraciones subinhibitorias de Tioestreptona: Se ensayaron 4 concentraciones de antibiótico; 10µg/ml (control), 5µg/ml, 1µg/ml y 0.1µg/ml. No se observó crecimiento celular en las concentraciones más altas de Tioestreptona (10µg/ml y 5µg/ml). Las concentraciones menores permitieron el crecimiento pero no indujeron cambios en la producción de tetraenos.
- Cambios en la temperatura de crecimiento: Se estudiaron cuatro temperaturas de crecimiento diferentes; 30°C (control), 25°C, 37°C y 42°C. Los análisis de los caldos de cultivos mostraban una producción equivalente a la del control para la temperatura de 25°C, un aumento en la producción relativa de compuestos amidados para el cultivo crecido a 37°C (Figura 3.18) y una falta de producción de polienos en el cultivo crecido a 42°C.

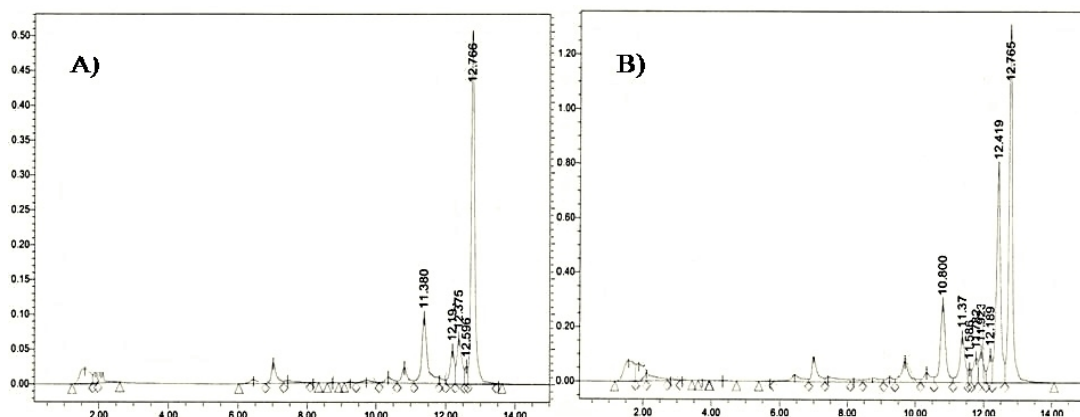


Figura 3.18: Efecto de la temperatura de incubación sobre la producción de compuestos amidados en *S. diastaticus* var. 108. A: cromatograma del caldo de cultivos de *S. diastaticus* var. 108 incubado a 30°C. B: cromatograma del caldo de cultivos de *S. diastaticus* var. 108 incubado a 37°C.

- Choque térmico: Se analizaron el caldo de fermentación procedente de un cultivo incubado 72 horas a 30°C tras someterle a un choque térmico de 42°C durante 3 horas, y el caldo de fermentación del cultivo anterior tras una incubación posterior de 15 horas a 30°C. En ambos casos la producción de polienos era similar a la del control, un cultivo crecido a 30°C durante 72H.

En todos los casos ensayados las esporas de *S. diastaticus* var. 108 fueron inoculados en medio de cultivo SYM2, y crecidos con una agitación de 250 r.p.m. durante 48 horas, a excepción del ensayo de choque térmico, y a una temperatura de 30°C, salvo en los casos de cambio de temperatura.

3.3.2.1 Análisis del estrés térmico en *S. diastaticus* var. 108.

Con objeto de estudiar las diferencias en la producción a lo largo del tiempo de los compuestos Rimocidina, Rimocidina B, CE-108 y CE-108B en función de la temperatura de crecimiento, se llevaron a cabo las curvas de producción de los mismos en *S. diastaticus* var. 108. Se tomaron muestras de cultivo a las 48, 72 y 96 horas para la extracción de compuestos y cuantificación de los mismos por HPLC (Figura 3.19).

Como se puede apreciar en la Figura 3.19 A, las producciones totales de polienos llegan a igualarse para ambas condiciones de crecimiento al llegar a las 96 horas de incubación, pese a que el crecimiento es más lento a 37°C. En las Figuras 3.19 B y C observamos *in vivo* un aumento en la producción de compuestos amidados únicamente cuando el crecimiento se mantiene a 37°C. Los porcentajes de amidación relativa en cada

punto de la curva para las distintas condiciones de temperatura se encuentran en la Tabla 3.7.

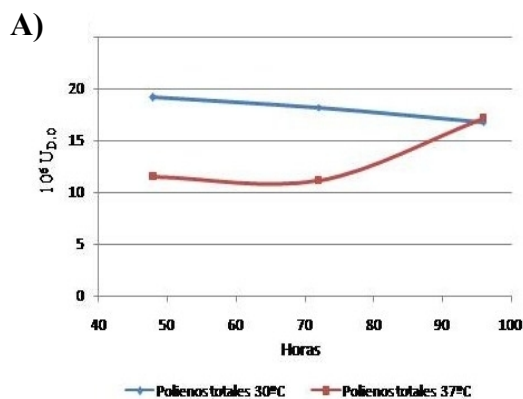
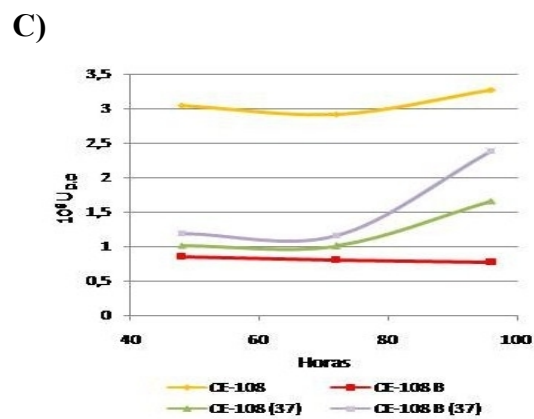
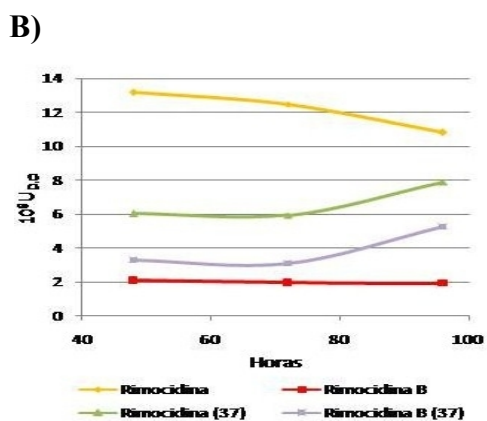


Figura 3.19: Estudio de la producción temporal de polienos en *S. diastaticus* var. 108 a las temperaturas de incubación de 30°C y 37°C. En la figura A se representa el total de polienos producidos en los tiempos 48,72 y 96 horas, en las figuras B y C se muestran las producciones de Rimocidina & rimocidina B y CE-108 & CE-108B respectivamente.



	% Amidación relativa	<i>S. diastaticus</i> var. 108 (30°C)	<i>S. diastaticus</i> var. 108 (37°C)
48 Horas	Rimocidina	13,65%	35,38%
	CE-108	21,30%	53,94%
72 Horas	Rimocidina	13,58%	34,32%
	CE-108	21,70%	53,48%
96 Horas	Rimocidina	15,22%	39,41%
	CE-108	19,06%	58,29%

Tabla 3.7: Porcentaje de amidación de los compuestos Rimocidina y CE-108 producidos por *S. diastaticus* var. 108 a 30°C y 37°C

Teniendo en cuenta la repercusión que tendría la obtención de compuestos polienos amidados únicamente sometiendo a la cepa productora de compuestos carboxilados a un cambio en la temperatura de crecimiento, quisimos ver el efecto que tenía el cambio de temperatura sobre la producción de polienos en una batería de cepas disponibles en el laboratorio. Las cepas testadas fueron: *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC108, *S. diastaticus* var. 108/pLEC303 y *S.sp.*RGU5.3 (Tabla 2.2 de Materiales y Métodos).

El análisis por HPLC del caldo de cultivo de *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC108 incubado a 37°C pone de manifiesto la presencia de compuestos amidados correspondientes a los tetraenos carboxilados presentes en esta cepa incubada a 30°C. Para *S. diastaticus* var. 108/pLEC303, en el cual el gen *pcsA* responsable de la amidación se encuentra bajo el promotor constitutivo *PerME**, observamos un aumento de la amidación con respecto al control incubado a 30°C. En *S. sp.*RGU5.3 el estrés producido por las condiciones de temperatura, no le permite producir compuestos tetraenos (Figura 3.20).

3.3.2.2 Obtención por estrés térmico de un mutante de *S. diastaticus* var. 108 productor de compuestos amidados.

En las cepas *S. diastaticus* var. 108/743B y *S. diastaticus* var. 108/784, el fenotipo productor de tetraenos amidados se mantiene incluso después de eliminar los plásmidos inductores (Seco, Miranzo et al. 2010); esto nos indica que el proceso que origina la amidación en estas cepas es irreversible. Con el objeto de determinar si el cambio hacia un fenotipo productor de polienos amidados observado en *S. diastaticus* var. 108 al someterlo a estrés térmico es irreversible, llevamos a colonia aislada el cultivo de *S. diastaticus* var. 108 incubado durante 5 días a 37°C. Las placas para la obtención de las colonias aisladas fueron incubadas a 30°C, transcurrido 5 días pudimos observar 3 tipos de colonias con fenotipos diferentes: 1) fenotipo silvestre, 2) colonia con coloración amarillenta y esporulación deficiente, 3) colonia con morfología rugosa y deficiencia de esporulación. Mediante el análisis por HPLC se observó una falta de amidación para el fenotipo silvestre, una capacidad de amidación baja para el segundo fenotipo y una alta capacidad de amidación para las colonias rugosas. Este último fenotipo presenta las mismas características en cuanto a morfología y producción de amidados que *S. diastaticus* var. 108 transformada con el plásmido SCP2* conteniendo el gen de resistencia a Eritromicina (Seco, Cuesta et al. 2005).

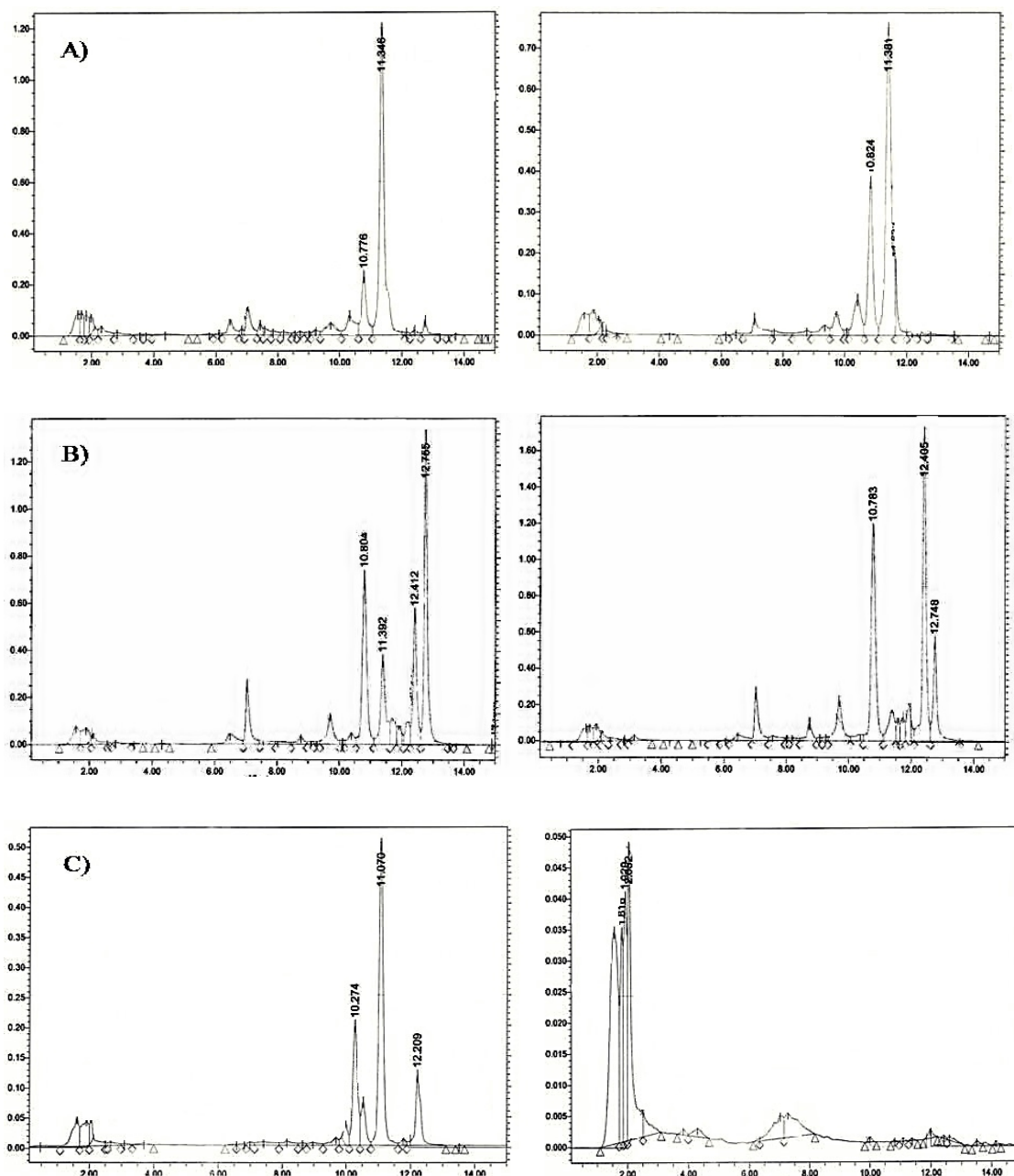


Figura 3.20: Análisis cromatográfico de la producción de polienos a 30°C y 37°C para distintas cepas de *Streptomyces*: A) *S. diastaticus* var. 108::PM1/pLEC101-pLEC108, B) *S. diastaticus* var. 108-pLEC303 C) *S. sp.RGU5.3*.

Realizamos un recuento de las colonias aisladas y crecidas a 30°C, procedente del cultivo líquido de *S. diastaticus* var. 108 incubado a 30°C y 37°C durante 5 días. La proporción de colonias rugosas frente al total de colonias fue 1/47 en las condiciones de crecimiento óptimas, mientras que en condiciones de estrés térmico la proporción aumenta hasta 1/8 colonias. Tras realizar varios pases en medio de cultivo líquido a una temperatura de 30°C, las colonias mantenían el fenotipo productor de compuestos amidados, sugiriendo

que el cambio producido por la alta temperatura de crecimiento es de tipo irreversible. A esta cepa productora de polienos amidados, obtenida mediante estrés térmico, se le dio el nombre de *S. diastaticus* var. 108-3730.

3.3.3 Análisis comparativo de la producción de tetraenos en *S. diastaticus* var. 108 y *S. diastaticus* var. 108-3730.

Nos propusimos realizar un análisis comparativo de las producciones de tetraenos a lo largo del tiempo en las cepas *S. diastaticus* var. 108 y el mutante obtenido por estrés térmico *S. diastaticus* var. 108-3730. La falta de esporulación de la cepa *S. diastaticus* var. 108-3730 hizo necesario realizar el estudio comparativo entre ambas cepas inoculando los cultivos a partir de micelio. Para ello crecimos las cepas en medio SYM2 líquido a 30°C. Tras un periodo de incubación de 48 horas el micelio fue centrifugado a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, lavado con sacarosa 10% y alicuotado en sacarosa 10% para su almacenamiento a -20°C hasta el momento de su uso para la inoculación de los medios.

Una limitación que nos encontramos a la hora de diseñar el experimento fue la dificultad por parte de la cepa mutada de restablecer el crecimiento una vez que el cultivo era parado para la toma de muestra, esto hizo necesario la realización del estudio a partir de cultivos en paralelo.

3.3.3.1 Análisis de la producción temporal de tetraenos en *S. diastaticus* var. 108 y *S. diastaticus* var. 108-3730.

Con el objeto de determinar las diferencias en la producción de tetraenos entre *S. diastaticus* var. 108 silvestre y *S. diastaticus* var. 108-3730, realizamos las curvas de producción a lo largo del tiempo de los compuestos Rimocidina, Rimocidina B, CE-108 y CE-108B en ambas cepas (Figura 3.21).

En las curvas de producción se puede observar como el inicio de la biosíntesis de polienos es diferente en ambas cepas, de tal forma que en la cepa silvestre observamos una producción importante de tetraenos a las 16 horas mientras que en la cepa mutada hasta las 24h no se aprecia indicios de producción.

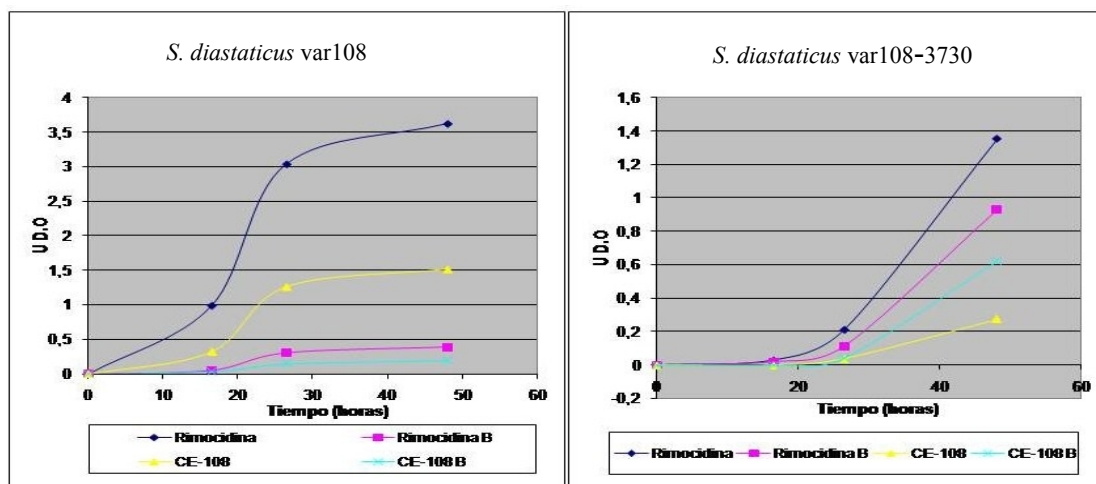


Figura 3.21: Representación de la producción temporal de los tetraenos Rimocidina, Rimocidina B, CE-108 y CE-108B para *S. diastaticus* var. 108 silvestre y *S. diastaticus* var. 108-3730.

Para acortar el desfase temporal en la producción de polienos entre ambas cepas se trabajó con diferentes inóculos para cada una de ellas, siendo de 0,4 μ g de micelio seco para la cepa mutada y 0,024 μ g para la cepa silvestre. Para determinar el inóculo de cada cepa, se realizaron varias curvas de producción de polienos con distinto tamaño de inóculo para cada cepa, finalmente tomamos aquellos en que la producción total de polienos se obtenía en tiempos no superiores a 4 días. Las curvas de crecimiento a partir del peso del micelio seco son equiparables (Figura 3.22), esto nos permite la comparación a lo largo del tiempo entre ambas cepas, tanto a nivel de producción como de expresión génica.

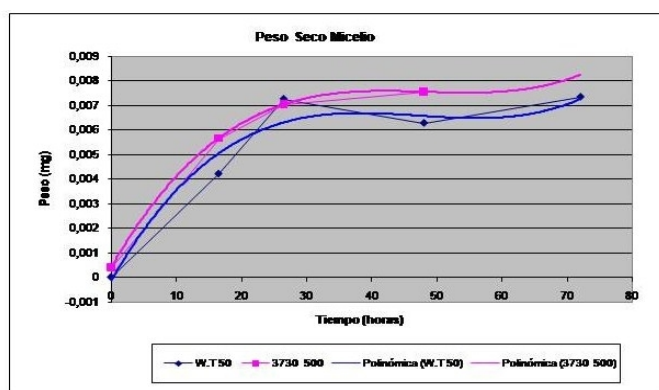


Figura 3.22: Curvas de crecimiento de *S. diastaticus* var. 108 y *S. diastaticus* var. 108-3730.

3.3.3.2 Análisis transcripcional de los genes *rimA* y *pcsA* mediante RT-PCR.

Para determinar las posibles causas que comprometen la producción de tetraenos amidados en la cepa silvestre *S. diastaticus* var. 108 a pesar de la presencia en su genoma

del gen responsable de la amidación, procedimos al análisis transcripcional mediante RT-PCR de los genes *rimA* y *pcsA*, ambos implicados en la producción de los tetraenos amidados. Como se ha expuesto de forma reiterada en el presente trabajo, el gen *rimA* codifica la PKS de arranque encargada de iniciar la biosíntesis de la cadena policetónica que da lugar a la macrolactona de la que derivan los compuestos carboxilados. Por su parte el gen *pcsA*, codifica una actividad amidotransferasa responsable directa de la producción de compuestos amidados mediante la transformación del carboxilo exocíclico de la macrolactona en amida primaria.

La extracción de ARN procedentes de los distintos tiempos de crecimiento de las cepas *S. diastaticus* var.108 y *S. diastaticus* var. 108-3730 fue realizado según lo descrito en la Sección 2.13 de Materiales y Métodos.

La transcriptasa reversa se utilizó usando como modelos distintos ARNs extraídos, una vez confirmada su calidad, y siguiendo las condiciones de detalladas en la Sección 2.14 de Materiales y Métodos.

Se diseñaron oligos para la amplificación de fragmentos internos de los genes *rimA*, *pcsA* y *hrdB*, este último codifica para el Factor Principal Sigma y es utilizado normalmente en el análisis de expresión por RT-PCR como control endógeno o *housekeeping* ya que mantiene su tasa de transcripción estable durante todo el ciclo de vida de la bacteria.(Pang, Aigle et al. 2004). Para el diseño de los oligos se utilizó el programa informático *Primer3 Software Tool* y de las varias parejas de oligos propuestas por el programa para cada gen, se eligieron las más adecuadas mediante el análisis realizado por el *Software Netprimer* (Sección 2.14 de Materiales y Métodos).

Las parejas de oligos utilizados para la amplificación de un fragmento interno de cada gen, así como alguna de sus características se presentan en la Tabla 3.8.

La eficiencia de la amplificación de los genes problemas, *pcsA* y *rimA*, y del gen control, *hrdB*, se analizó mediante la realización de rectas de estandarización a partir de diluciones sucesivas de orden 10 de ADN genómico de *S. diastaticus* var. 108 (Figura 3.23).

Oligo	Secuencia	Inicio en el gen	Tamaño del amplicón
<i>HrdB.D</i>	CGCGGCATGCTCTTCCT	1221	110
<i>HrdB.R</i>	AGGTGGCGTACGTGGAGAAC	1330	
<i>AsnB.uni</i>	GGCATCAAGCCCTTCTACTT	433	99
<i>AsnB.rev</i>	GATCACCCGCTTGAACATC	531	
<i>rimA.uni</i>	GCTGACCTCGGTGATGTG	3702	121
<i>rimA.rev</i>	GGACTCGTACAGCCGGTAG	3822	

Tabla 3.8: Oligos usados para la amplificación por RT-PCR de los genes: *hrdB*, *pcsA* y *rimA*.

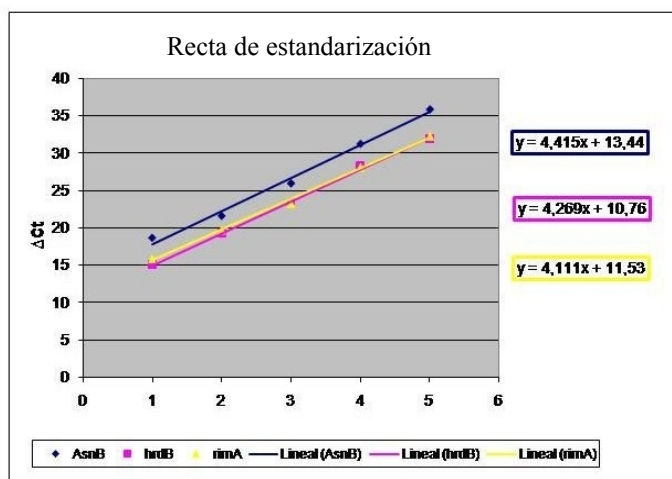


Figura 3.23: Representación gráfica y ecuaciones de las rectas de estandarización para los genes *hrdB*, *pcsA* y *rimA*.

Valores semejantes en las pendientes de las rectas de estandarización implican una eficiencia similar en la amplificación de los distintos genes a partir de sus correspondientes oligos, esto nos permite realizar una cuantificación relativa de los genes evitando realizar curvas de estandarización para cada muestra.

Cuantificación de la expresión de los genes *pcsA* y *rimA*.

Los valores relativos de expresión para los genes *pcsA* y *rimA*, en las cepas *S. diastaticus* var.108 y *S. diastaticus* var. 108-3730, expresados como ΔC_t son representados frente al tiempo de crecimiento en la Figura 3.25. Observamos como en la cepa silvestre la expresión de *pcsA* disminuye a lo largo del tiempo, mientras que *rimA* aumenta la expresión, llegando al máximo cuando ya han descendido los valores de *pcsA*. En el caso de la cepa mutada por estrés térmico la expresión de ambos genes es paralela y

en incremento a lo largo del tiempo. También se pone de manifiesto la disminución y más tardía expresión de *rimA* en la cepa *S. diastaticus* var. 108-3730. Esto se corresponde con el retraso en la producción de polienos que observábamos en la Figura 3.21.

En la cepa silvestre, el gen *pcsA* alcanza la máxima expresión a las 10 horas de crecimiento, pese a ello, la expresión de *rimA* es del orden de 21,11 veces mayor. Si realizamos esta cuantificación relativa de ambos genes a las 16 horas de crecimiento, donde la expresión de *rimA* alcanza su máximo, vemos que este se expresa 71.1 veces más que *pcsA*. En el caso de *S. diastaticus* var. 108-3730 a las 48 horas vemos la máxima expresión tanto para *rimA* como para *pcsA*, existiendo únicamente una diferencia de expresión del orden de 1,51 veces a favor de *rimA*.

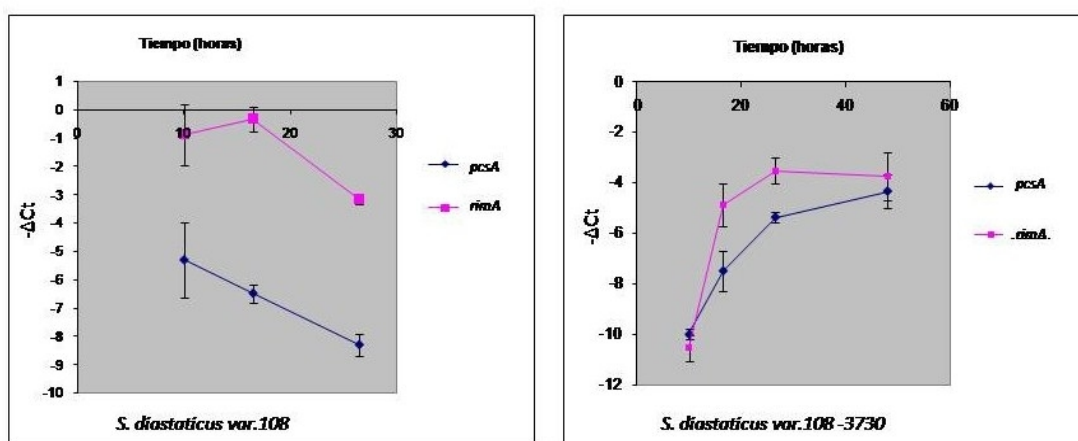


Figura 3.25: Expresión temporal de los genes *pcsA* y *rimA* en *S. diastaticus* var. 108 y *S. diastaticus* var. 108-3730.

Estos resultados nos llevan a concluir que en la cepa silvestre, la expresión del gen responsable de la amidación, *pcsA*, es menor que la expresión del gen *rimA*, implicado en el inicio de la síntesis del sustrato polieno de PcsA. Además, la existencia de un desfase temporal en la expresión de ambos genes hace que la proteína PcsA no esté presente, en concentraciones adecuadas, antes de que los polienos carboxilados sean bombeados por los transportadores Tipo ABC y expulsados al exterior celular. En definitiva, la mayor concentración en la célula de PcsA ocurriría cuando la mayor parte de su sustrato polieno ha sido bombeado al exterior celular. Este hecho explica el porqué la producción de tetraenos amidados en la cepa *S. diastaticus* var. 108 es únicamente minoritaria, al mismo tiempo sugiere la necesidad de la existencia de sustrato natural diferente a los compuestos polienos para la amidotransferasa PcsA.

Los resultados transcripcionales obtenidos de la cepa *S. diastaticus* var. 108-3730 muestran, a diferencia de la cepa silvestre, una expresión paralela en el tiempo de ambos genes, que permite la coexistencia en la célula tanto de PcsA como de los tetraenos carboxilados, de tal forma que la concentración intracelular permitiría que PcsA pueda transformarlos en los correspondientes compuestos amidados. Esto explicaría la presencia de los altos niveles de compuestos amidados en esta cepa.

4 DISCUSIÓN

Los avances en la medicina actual, tales como trasplantes de órganos ó el uso de inmunosupresores en el tratamiento de ciertas enfermedades, han llevado paradójicamente, a un importante aumento en la incidencia de infecciones fúngicas, con el consecuente incremento de micosis sistémicas asociadas a graves cuadros clínicos. La situación es altamente comprometida, debido a la disponibilidad de una farmacopea limitada en cuanto al tratamiento de estas infecciones, con un número muy limitado de agentes terapéuticos plenamente eficaces. Esta realidad ha provocado un incremento de los esfuerzos hacia la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, ya que el fármaco estrella en el tratamiento de las infecciones fúngicas, el macrólido polieno anfotericina B, presenta importantes problemas de toxicidad. Sin embargo, su uso clínico durante las últimas décadas ha demostrado poseer una alta eficacia frente a sus dianas microbianas, y que, además de gozar de un amplio espectro de acción fungicida, presenta una baja incidencia en la aparición de resistencias. Estas características son compartidas con otros fármacos del grupo de los macrólidos polienos. Por ello los macrólidos polienos son considerados, en general, como antimicrobianos de gran eficacia con un amplio espectro de acción frente a hongos. Pese a ello, el mayor problema que presenta este grupo de antibióticos es la citotoxicidad relativamente alta y baja solubilidad en agua.

En los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos para obtener derivados de Anfotericina B con menor toxicidad y mayor solubilidad sin que afecte sustancialmente a la actividad antimicrobiana. Fruto de esos esfuerzos ha sido la obtención, mediante semisíntesis orgánica, de una serie de derivados que han sido ensayados como posibles alternativas clínicas a la propia Anfotericina (Mazerski and Borowski 1995; Szlinder-Richert, Mazerski et al. 2001; Paquet, Volmer et al. 2008). Aunque ninguno de ellos ha superado el umbral establecido respecto a la toxicidad, los datos obtenidos han sido importantes para conocer aspectos críticos sobre la relación estructura-función de anfotericina B. La información obtenida ha permitido conocer que el cambio de la carga negativa del carboxilo exocíclico y micosamina origina mejoras farmacológicas al disminuir la toxicidad, aumentar la actividad antimicrobiana o incrementar la solubilidad (Cybulska, Bolard et al. 1995; Szlinder-Richert, Mazerski et al. 2001; Paquet, Volmer et al. 2008). Entre los aspectos estructurales críticos de la molécula caben destacar: carga iónica del grupo carboxílico exocíclico, naturaleza de la molécula de azúcar y/o hidrofobicidad al cambiar algunos grupos funcionales de la cadena de polirol. Más recientemente, los cambios en la formulación farmacéutica de este

fármaco han permitido generar preparaciones lipídicas de Anfotericina con reducida citotoxicidad (Coukell and Brogden 1998; Yardley and Croft 1999; Risovic, Boyd et al. 2003). La aplicación de la ingeniería genética ha proporcionado una nueva dimensión en la búsqueda de nuevas estructuras poliénicas bioactivas ó en la mejora de moléculas pre-existentes (Mendes, Recio et al. 2001; Brautaset, Bruheim et al. 2002; Seco, Cuesta et al. 2005; Borgos, Sletta et al. 2006; Caffrey, Aparicio et al. 2008). En base a todo ello, los compuestos poliénicos parecen ofrecer un modelo atractivo para obtener nuevos compuestos con actividad antifúngica con reducida toxicidad.

S. diastaticus var. 108 codifica en su genoma el *cluster* biosintético del macrólido polieno Rimocidina, un tetraeno con actividad antifúngica que también es producido por *S. rimosus*. La caracterización preliminar de *S. diastaticus* var. 108 puso de manifiesto que, cambiando algunas condiciones de cultivo, la cepa era capaz de producir además de Rimocidina otro tetraeno: CE-108. El aislamiento de algunos genes de la biosíntesis de Rimocidina, reveló que ambos polienos compartían la misma ruta biosintética (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004). Las diferencias estructurales entre los dos tetraenos (Rimocidina y CE-108) de *S. diastaticus* var. 108 confirmaron que ambos tetraenos son sintetizados gracias a la elección, por parte del llamado “módulo de carga” (RimA), entre dos posibles ácidos carboxílicos activados (acetil-CoA ó butiril-CoA), sobre los que se inician las sucesivas condensaciones. En este trabajo se pone de manifiesto la capacidad de reconocimiento por parte de la proteína RimA de una nueva unidad iniciadora, propil-CoA, que incorporada a la ruta de biosíntesis conduce a la formación de Rimocidina D, un nuevo derivado biosintético con presencia de una cadena lateral etilo en lugar de las metilo y propilo propias de CE-108 y rimocidina, respectivamente. Esta característica biosintética proporciona a la PKS RimA una versatilidad en el reconocimiento de sustrato interesante como herramienta para la obtención de nuevos metabolitos bioactivos. Por otro lado, la condensación de la cadena policetónica sobre diferentes unidades sugiere que otras PKSs de la ruta de Rimocidina serian capaces también de reconocer la cadena creciente con diferentes unidades iniciadoras, lo que también le confiere cierta versatilidad metabólica a esta ruta de biosíntesis.

La heterogeneidad de las cadenas policetónicas en *S. diastaticus* var. 108 contrasta con la observada en *S. natalensis* (iniciada con PimS0) cuando se analiza por expresión heteróloga. Los datos aportados en este trabajo confirman que *S. natalensis* es incapaz de iniciar con butiril-CoA en *S. diastaticus* var. 108, ya que en la complementación

heteróloga de *rimA* con *pimS0* en esta cepa solamente parece progresar la cadena policetónica que inició con acetil-CoA generando CE-108 pero no Rimocidina

Sin embargo, en la ruta biosintética de Nistatina de *S. noursei* hemos podido demostrar que el producto de *nysA* sí posee una mayor flexibilidad en el reconocimiento de unidades iniciadoras. La expresión heteróloga del Híbrido C (*nysA/rimA*), el cual posee el dominio AT de *nysA*, en el contexto genético de *S. diastaticus* var. 108::PM1pLEC101 (disruptante en *rimA*) es capaz de generar tanto Rimocidina como CE-108, sugiriendo que ambas unidades (acetil-CoA y butiril-CoA) pueden ser incorporadas indistintamente para el inicio de la cadena policetónica.

De este hecho se deduce que la ausencia en *S. noursei* de derivados de nistatina procedente de unidades iniciadoras acetil-CoA no se debe a una selectividad restrictiva por parte de NysA (como ocurre en *S. natalensis* con su módulo de carga PimS0), sino que el cuello de botella del sistema biosintético de Nistatina se encontraría en alguna de las restantes PKSs del sistema de biosíntesis de polienos: NysB, NysC, NysI, NysJ ó NysK, que actuaría de filtro para las cadenas policetónicas iniciadas con butiril-CoA. Esta hipótesis se ve apoyada con los resultados obtenidos en el grupo de Zotchev los cuales nos han sido facilitados por comunicación personal, donde no se aprecian derivados de nistatina con origen biosintético diferente a acetil-CoA cuando se complementa con *rimA* el disruptante en el módulo de carga *nysA*. La expresión de *rimA* en dicho disruptante, se realizó conjuntamente con el gen *rimJ*, excluyéndose así que la causa de la falta de tales derivados de Nistatina fuera la disponibilidad en *S. noursei* de moléculas de butiril-CoA. Es interesante remarcar que en el disruptante *nysA* complementado con *rimA*, tampoco fueron encontrados derivados de Nistatina con incorporación de propionil-CoA como unidad iniciadora, este hecho puede ser consecuencia de la falta de reconocimiento de esta unidad iniciadora, directamente por parte de NysA, ó al igual que ocurre con el inicio butiril-CoA, que sea otra PKS la que filtre el sistema de síntesis. Para poder determinar si NysA es capaz, al igual que RimA, de reconocer propionil-CoA como unidad iniciadora, habría sido necesario expresar los híbridos *rimA-nysA* en el contexto genético que permita el reconocimiento de la cadena policetónica en formación con esta unidad iniciadora (*S. diastaticus* var. 108), al mismo tiempo que se encuentre limitada la disponibilidad de la unidad iniciadora butiril-CoA (interrupción del gen *rimJ*), favoreciéndose así el inicio biosintético con otros ácidos carboxílicos activados.

Hasta donde hemos podido determinar en este trabajo, RimA dispone de una extraordinaria versatilidad en el reconocimiento de estructuras iniciadoras que serían, al menos: acetil-CoA, butiril-CoA y propionil-CoA. Si además tenemos en cuenta que el resto de las PKSs de biosíntesis de Rimocidina son capaces de reconocer las tres cadenas policetónicas derivadas de los diferentes inicios, podemos concluir que la ruta biosintética de Rimocidina en *S. diastaticus* var. 108 constituye un excelente modelo para abordar la obtención de nuevos polienos bioactivos. Resulta interesante señalar que la disrupción del gen asociado al cluster biosintético de Rimocidina, codificante de la actividad crotonil-CoA reductasa (*rimJ*), no bloquea la producción de Rimocidina. En esta situación cabría esperar que Rimocidina no fuera sintetizada por falta de disponibilidad de unidades iniciadoras y/o de elongación por el módulo de elongación 13, en cuyo caso también se vería afectada la síntesis de CE-108 (Seco, Perez-Zuniga et al. 2004). Este dato parece sugerir que en el genoma de *S. diastaticus* var. 108 existe una segunda actividad que proporcionaría las unidades de butiril-CoA necesarias para la biosíntesis. Es más, cuando se analizan los caldos de cultivo del disruptante en *rimJ* de *S. diastaticus* var. 108 se aprecian incrementos de compuestos que en el silvestre se producen en concentraciones muy minoritarias, como son los compuestos Rimocidina D y CE-108D. La presencia de estos compuestos revela la existencia de un nuevo punto de flexibilidad en la ruta biosintética de polienos macrólidos en *S. diastaticus* var. 108, concretamente el módulo de elongación número 13, que podría generar un ciclo de extensión incorporando malonil-CoA, en lugar de etilmalonil-CoA. Por tanto, el incremento en la tasa de biosíntesis de CE-108D en *S. diastaticus* var. 108, nos ha permitido identificar un punto adicional de versatilidad de la ruta biosintética de Rimocidina como posible diana para la diversificación de metabolitos bioactivos.

Si tenemos en cuenta la lógica biosintética de *S. diastaticus* var. 108, cabe esperar la existencia de otros compuestos minoritarios que serían consecuencia de la iniciación con butiril-CoA o propionil-CoA por parte de RimA y con una elongación por parte del módulo 13 de metilmalonil-CoA. Concretamente en la Figura 3.9 se puede observar la presencia, en concentraciones minoritarias, de un compuesto cuyo tiempo de retención es mayor que el de Rimocidina D y menor que el de Rimocidina, este nuevo compuesto podría ser el correspondiente al tetraeno cuyo inicio biosintético es butiril-CoA e incorpora en el módulo 13 de elongación metilmalonil-CoA, originando las cadenas laterales propilo y metilo en los carbonos C₂₇ y C₂ respectivamente. Resumiendo podemos esperar que a partir de inicio con acetil-CoA, butiril-CoA ó propionil-CoA se pudieran generar por parte del módulo 13 la incorporación bien de etilmalonil-CoA ó

metilmalonil-CoA, pudiéndose obtener hasta 6 estructuras químicas diferentes. Hasta el presente solo hemos podido determinar 4 de las 6 posibles estructuras que razonablemente se pueden predecir.

Los datos aportados confirman la gran diversidad de metabolitos que la ruta biosintética de Rimocidina en *S. diastaticus* var. 108 es capaz de generar. Esta observación adquiere mayor relevancia si tenemos en cuenta ahora que cada uno de los polienos anteriormente mencionados es susceptible, además, de modificación de “adorno” por parte de la amidotransferasa PcsA. Nuevos polienos amidados vienen ahora a incrementar el abanico de posibles estructuras biosintetizadas por *S. diastaticus* var. 108. Estas nuevas estructuras amidadas (CE-108E y Rimocidina E) vienen a sumarse a las ya conocidas previamente: CE-108B y Rimocidina B.

En la Figura 4.1 se engloban las estructuras de polienos tetraenos aislados ó previstos de recombinantes genéticos de *S. diastaticus* var. 108.

Nuestro estudio con los compuestos Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E, nos ha permitido correlacionar algunos aspectos relacionados con la relación estructura/actividad biológica. Así, una reducción en tamaño de las cadenas laterales de los C₂ y C₂₇ da lugar a una disminución de la toxicidad (como muestran los resultados de hemólisis), y disminución de hidrofobicidad (disminución en los tiempos de retención en el análisis cromatográfico). También hemos podido observar, como el efecto de disminución de toxicidad es independiente de si la reducción en el número de carbonos se produce en la cadena hidrocarbonada de C₂ o C₂₇. La determinación de las CMIs₁₀₀ revela una disminución de la actividad antifúngica al disminuir el tamaño de las cadenas hidrocarbonadas exocíclicas de C₂ y C₂₇. Sin embargo, la disminución en el tamaño de estas cadenas, correspondiente a la pérdida de un grupo -CH₂, no siempre genera el mismo efecto, como ejemplo de ello observamos en los estudios realizados frente *I. orientalis*, *F. neoformans* y *P. chrysogenum*, como la sustitución de un radical propilo en C₂₇ (Rimocidina B) por un radical etilo (Rimocidina E) proporciona una disminución de la actividad antifúngica menor a la originada al sustituir un radical etilo en C₂₇ (Rimocidina E) por un radical metilo (CE-108B) (Tablas 3.2 y 3.3 de Resultados). Sin embargo, en el caso frente *A. niger*, esta reducción de tamaño en la cadena hidrocarbonada exocíclica de C₂₇ en los polienos Rimocidina B, Rimocidina E y CE-108B siempre genera un efecto similar. Por ello consideramos que el tamaño de estas

cadenas, junto con la naturaleza lipídica de las paredes de hongos, guarda importancia en la interacción polieno-esterol.

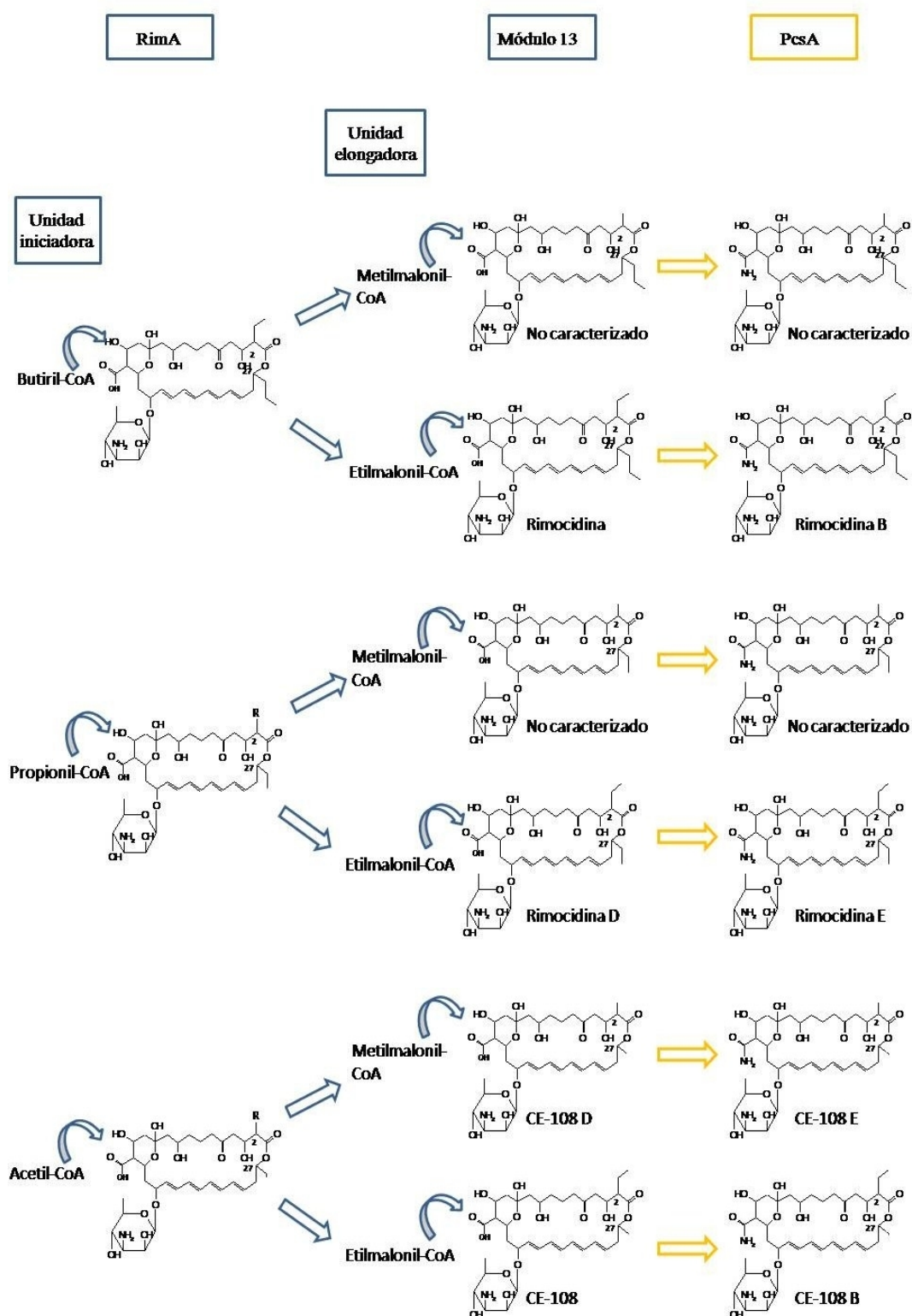


Figura 4.1: Compuestos polienos aislados de recombinantes genéticos de *S. diastaticus* var. 108 ó previstas a partir de las estructuras de los tetraenos conocidos.

Los resultados de actividad antifúngica y hemolítica de los compuestos Rimocidina E y CE-108E, han mostrado una mayor toxicidad selectiva de estos tetraenos hacia membranas con ergosterol que con colesterol, como ocurre con los estructural y biosintéticamente relacionados Rimocidina B y CE-108B (Seco, Cuesta et al. 2005). Todos ellos, Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E, han demostrado una mejora farmacológica con respecto al fármaco de referencia, Anfotericina B, ya que pese a poseer una menor actividad antifúngica, la baja toxicidad que presentan les permite aumentar la dosis hasta concentraciones que igualan la actividad antifúngica de Anfotericina B, presentando unos efectos tóxicos muy inferiores. De tal forma que, si las CMIs₁₀₀ calculadas para anfotericina B frente a las distintas cepas puede producir entre el 20-100 % de hemólisis, las CMIs₁₀₀ correspondientes a Rimocidina B no superen el 10%, las de CE-108 el 3% y las CMIs₁₀₀ obtenidas para Rimocidina E, y CE-108E no producen efectos hemolíticos (Figura 4.2). Vemos como el rango de concentraciones con actividad antifúngica para Anfotericina B es prácticamente el mismo que produce un efecto hemolítico, se trata pues de un fármaco con una ventana terapéutica estrecha, donde pequeñas variaciones en la dosis producen importantes cambios en la actividad hemolítica. Por el contrario, los polienos amidados producidos por *S. diastaticus* var.108 presentan CMIs₁₀₀ alejadas de las concentraciones que conllevan la aparición de efecto hemolítico (o bajos niveles de hemólisis como ocurre con Rimocidina B), presentando así una ventana terapéutica más amplia, que harían del uso de estos de antifúngicos una terapia más segura. Es por ello que estos nuevos polienos pueden ser considerados como una posible futura alternativa terapéutica a la Anfotericina B en el tratamiento de infecciones fúngicas.

El análisis realizado sobre Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E, sugiere que los compuestos Rimocidina E y CE-108B son los más prometedores de los estudiados en la presente memoria, ya que muestran una importante actividad antifúngica, a unas concentraciones no hemolíticas (3% de hemólisis). Sin embargo, no se debe descartar Rimocidina B, ya que posee una buena actividad a concentraciones asociadas a un débil incremento hemolítico. Por su parte, CE-108E ha mostrado una baja actividad antifúngica, con unas CMIs₁₀₀, que según el método utilizado considera al tetraeno como no activo frente a los microorganismos testados, sin embargo, estudios paralelos realizados por el grupo del profesor Pedro Bonay del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (Madrid) parecen sugerir que CE-108E puede tener un papel destacado como antiparasitario frente a *Leishmania*.

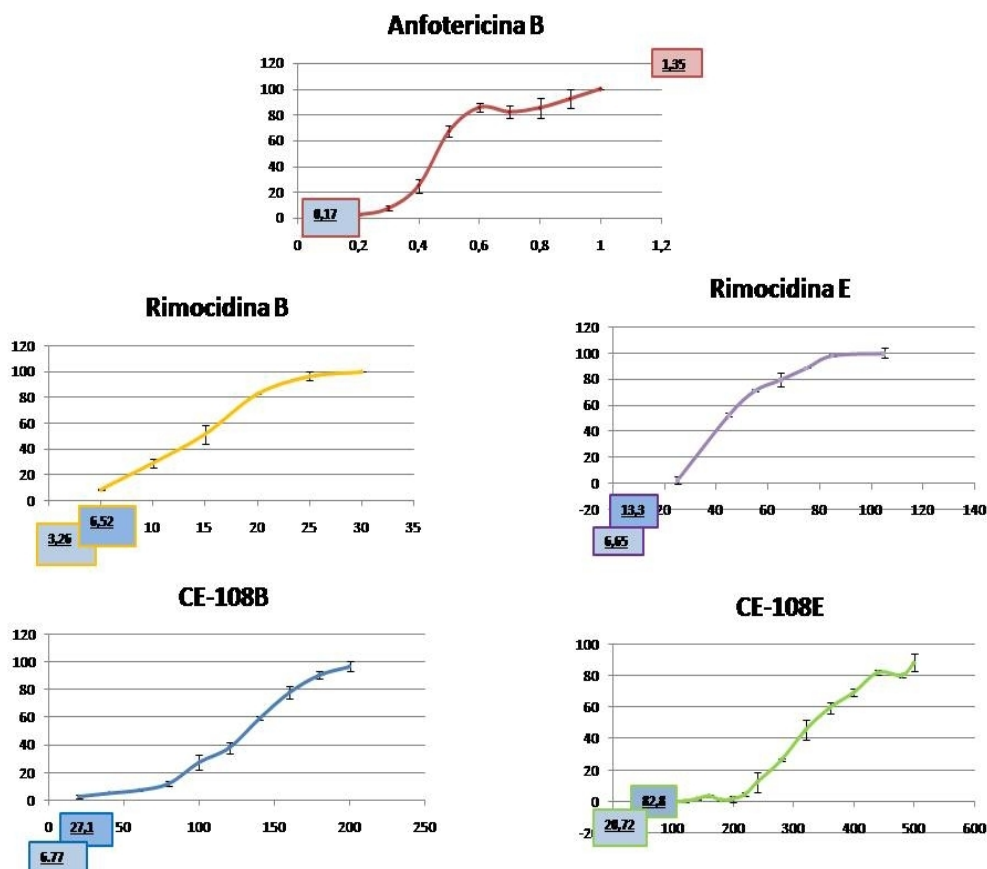


Figura 4.2: Graficas de los polienos Anfotericina B, Rimocidina B, Rimocidina E, CE-108B y CE-108E donde se correlacionan las concentraciones de cada uno de ellos con los porcentaje de hemólisis que producen, resaltando el mayor y menor valor de las CMI₁₀₀ obtenidos en las cepas testadas para cada

Este tipo de ensayos frente a endoparásitos, donde el microorganismo diana se encuentra en el interior de la célula hospedadora, nos proporciona una primera información sobre la biodisponibilidad de estos nuevos tetraenos, que aunque lejos de un sistema *in vivo*, sí muestra la capacidad de interaccionar con la membrana del parásito y ejercer su actividad biocida tras haber atravesado la membrana celular del macrófago. En principio estos ensayos sugieren que el aumento de la solubilidad implica una mejora en la biodisponibilidad, dado el incremento de la actividad antiparasitaria.

Los datos disponibles hasta el presente, confirman que los derivados amidados ensayados presentan mayor especificidad hacia los microorganismos diana que los correspondientes carboxilados. Dada esta ventaja farmacológica derivada de la amidación, vía enzimática ó química, del carbono exocíclico de macrólidos polienos (Jarzebski, Falkowski et al. 1982; Odds, Brown et al. 2003; Seco, Cuesta et al. 2005;

Paquet, Volmer et al. 2008), así como las dificultades técnicas y económicas que suponen la obtención de estos derivados vía síntesis o semisíntesis química, supondría un gran adelanto en la búsqueda de nuevos antifúngicos la obtención de una herramienta para la producción *in vivo* de polienos amidados. Para el desarrollo de esta herramienta contamos con las amidotransferasas PcsA (Seco, Miranzo et al. 2010) y PcsB (Miranzo, Seco et al. 2010), capaces modificar del carboxilo exocíclico de algunos macrólidos polienos.

PcsA y PcsB son las primeras amidotransferasas descritas capaces de reconocer como sustrato macrólidos polienos, sin embargo, diferencias en sus estructuras primarias determinan diferencias en la especificidad de sustratos. La obtención mediante ingeniería genética de los Híbridos: P1, P2, P3 y P4, han confirmado que, al igual que otras asparagina sintasas, la ubicación de la actividad catalítica de formación del grupo amida al polieno sustrato se encuentra en el dominio sintasa. Además, ha sido posible la determinación de una secuencia de aminoácidos (382 al 510) donde algunos de sus residuos parecen desempeñar una función importante en la especificidad de sustrato, dicha secuencia ha podido ser localizada a través de la valoración de la capacidad de reconocimiento (en % de conversión) en el Híbrido P4 (mayor porcentaje de conversión para Pimaricina) con respecto a PcsA y los Híbridos P2 y P3 (mayor porcentaje de conversión para CE-108) (Tabla 3.6 de Resultados). Dentro de esta secuencia son 16 los residuos que difieren de una proteína a otra, de los cuales 11 no son estructuralmente equivalentes. Cabe pensar que al menos algunos de estos aminoácidos interaccionarían más íntimamente con la molécula de Pimaricina, y aunque este cambio en la estructura primaria de PcsA no confiera una especificidad tan rígida como la de PcsB, sí parece establecer ciertos impedimentos posiblemente estéricos hacia el polieno CE-108 a favor del reconocimiento de Pimaricina. Posiblemente una interacción con el grupo epóxido de Pimaricina por parte de algunos de estos residuos, o una disminución en el tamaño del bolsillo específico que aunque no limite, si podría dificultar la entrada de CE-108 debido a la presencia del grupo exocíclico etilo en C₂, sea la causa del cambio de especificidad cuantitativa de sustrato en el Híbrido P4. Este aspecto podría ser clarificado mediante el análisis de la capacidad de reconocimiento, por parte del Híbrido P4, del polieno recientemente descrito JBIR-13, cuya estructura química, análoga a la de Pimaricina, presenta un grupo epóxido y una cadena lateral propilo en lugar del metilo (Komaki, Izumikawa et al. 2009). Al mismo tiempo, la diferencia estructural que presenta en la molécula de azúcar, también nos aportará información sobre la importancia de esta en la interacción polieno-amidotransferasa.

Estos mismos aminoácidos también pueden ser los responsables de la existencia de impedimentos estéricos en PcsA que limitan el reconocimiento de otros polienos de mayor tamaño como puede ser Anfotericina B.

Estudios sobre la conformación estructural tanto de las amidotransferasas naturales, PcsA y PcsB, como de los Híbridos, P1, P2, P3 y P4, junto con el conocimiento de las especificidades de sustratos para cada uno de ellos, nos podrían facilitar la información necesaria para realizar los cambios en la secuencia de aminoácidos que derivasen en una disminución de la rigidez en el reconocimiento de sustratos. Mediante los cambios dirigidos en la secuencia de aminoácidos podríamos obtener amidotransferasas capaces de reconocer un mayor número de sustratos polienos, pudiendo generar *in vivo* sus correspondientes derivados amidados con mejoras farmacológicas asociadas. La obtención del derivado amidado de Anfotericina B mediante la incorporación en *S. nousei* de una amidotransferasa “a la carta”, obtenida por ingeniería genética, portadora de los cambios necesarios para el reconocimiento *in vivo* del heptaeno, supondría la producción a gran escala, y de forma rentable, de un potencial fármaco para el tratamiento de micosis sistémicas, capaz para convertirse en alternativa clínica a Anfotericina B.

Los datos cristalográficos de PcsA y/o PcsB que próximamente podrían ser obtenidos, permitirán en un futuro el análisis de la interacción estructura proteína-sustrato, que nos facilite el conocimiento de los residuos cuya incorporación en la estructura primaria reduzca la rigidez en la especificidad de sustrato, ó disminuya el reconocimiento de unos a favor de otros. Estudios de modelización de las distintas amidotransferasas en base a la estructura tridimensional de la asparragina sintasa de *E. coli*, con la que tanto PcsA como PcsB presentan mayor homología según la base de datos, no nos ha proporcionado información de interés. La falta de homología entre la secuencia de aminoácidos de los dominios sintasa de la asparragina sintasa de *E. coli* y las amidotransferasas PcsA y PcsB, da lugar a la predicción Bioinformática de modelos tridimensionales que no permiten reconocer modificaciones estructurales derivados de diferencias en la secuencia de aminoácidos de PcsA, PcsB y los Híbridos P1, P2, P3 y P4.

La presencia de *pcsA* fuera del *cluster* de biosíntesis de polienos en *S. diastaticus* var. 108 sugiere que la función primaria para esta proteína podría ser otra diferente a la de amidar polienos. Los análisis por RT-PCR revelan una expresión temprana de *pcsA* que parece apoyar dicha teoría, aportando datos que nos lleva a pensar en un papel dentro del

metabolismo primario para esta proteína, ya que su expresión coincide con la fase exponencial de crecimiento, donde aun no son expresados los genes implicados en el metabolismo secundario, como es el caso de la síntesis de polienos.

Los datos proporcionados en este trabajo sugieren que la sincronización de la transcripción de *pcsA* y *rimA* es crítico para la obtención de derivados amidados en concentraciones altas. En *S. diastaticus* var. 108-3730, donde el fenotipo productor de tetraenos amidados es irreversible, hemos observado mediante RT-PCR que los cambios genéticos producidos afectan a la expresión temporal tanto de *pcsA* como de *rimA*, de manera que permiten la coexistencia de la actividad de PcsA con la presencia del polieno carboxilado. Al mismo tiempo, la síntesis de los polienos se ve disminuida pero se prolonga en el tiempo, de modo que, si asumimos una mayor afinidad hacia el polieno por parte de PcsA que por parte del transportador, podríamos decir que la producción ralentizada de polieno evita la saturación de PcsA, y por tanto conduce a la captación de un menor número de moléculas de polieno no amidado por parte de los transportadores. Esta hipótesis permitiría explicar el aumento de polieno amidado en la cepa *S. diastaticus* var. 108-pLEC303 al incubarla a 37°C, ya que en este caso la teoría de la coexistencia de ambas moléculas es insuficiente para explicar este aumento, puesto que en esta cepa la expresión de *pcsA* es constitutiva y permite por sí misma la coexistencia de la proteína y el polieno carboxilado.

Este trabajo nos ha permitido descartar cualquier tipo de modificación postranscripcional/postraducciona sobre la proteína PcsA como responsable del aumento de producción de compuestos amidados en la cepa *S. diastaticus* var.108-3730, se trata pues de modificaciones que afectan a nivel transcripcional. Dado que probablemente PcsA pertenece al metabolismo primario, y la síntesis de antibióticos se engloba dentro del metabolismo secundario, consideramos que algún componente de la regulación global, algún regulador pleiotrópico, podría haber sido afectado de forma irreversible por el estrés térmico, pudiendo ser el responsable de los cambios de expresión en los genes *pcsA* y *rimA* que permiten la producción de tetraenos amidados en *S. diastaticus* var.108-3730. Desgraciadamente no nos ha sido posible identificar un posible regulador que nos diera la clave para postular el mecanismo por el que *S. diastaticus* var. 108, sometido a cierto estrés térmico, ha sincronizado parcialmente la transcripción de *pcsA* y *rimA* hasta el punto de generar concentraciones significativas de polienos amidados.

Dada la complejidad que presentan los sistemas de regulación son muy numerosos los puntos de esta cascada que podrían originar el efecto que nosotros hemos detectado, como una de las alternativas posibles, proponemos que podría estar afectado de forma directa o indirecta el sistema de dos componentes PhoR-PhoP. PhoP produce un efecto negativo sobre el metabolismo del nitrógeno, en el cual podría estar involucrada la asparragina sintasa *PcsA*, esto podría explicar una baja expresión del gen *pcsA* en la fase exponencial de crecimiento en *S. diastaticus* var. 108-3730. También es interesante recordar que la localización en el cromosoma tanto de *pcsA* como *pcsB* se encuentran cercanas al operón *pho* (Miranzo, Seco et al. 2010 ; Seco, Miranzo et al. 2010). Por otro lado, es considerada la regulación negativa de la expresión de *afsS* por parte de PhoP (Santos-Beneit, Rodriguez-Garcia et al. 2009), donde AfsS está relacionada con la activación de la producción de algunos antibióticos (Vogtli, Chang et al. 1994; Floriano and Bibb 1996), por lo que una activación de PhoP podría originar una disminución de la expresión de los genes del *cluster* de biosíntesis de Rimocidina/CE-108 tanto en la fase exponencial como en la fase estacionaria.

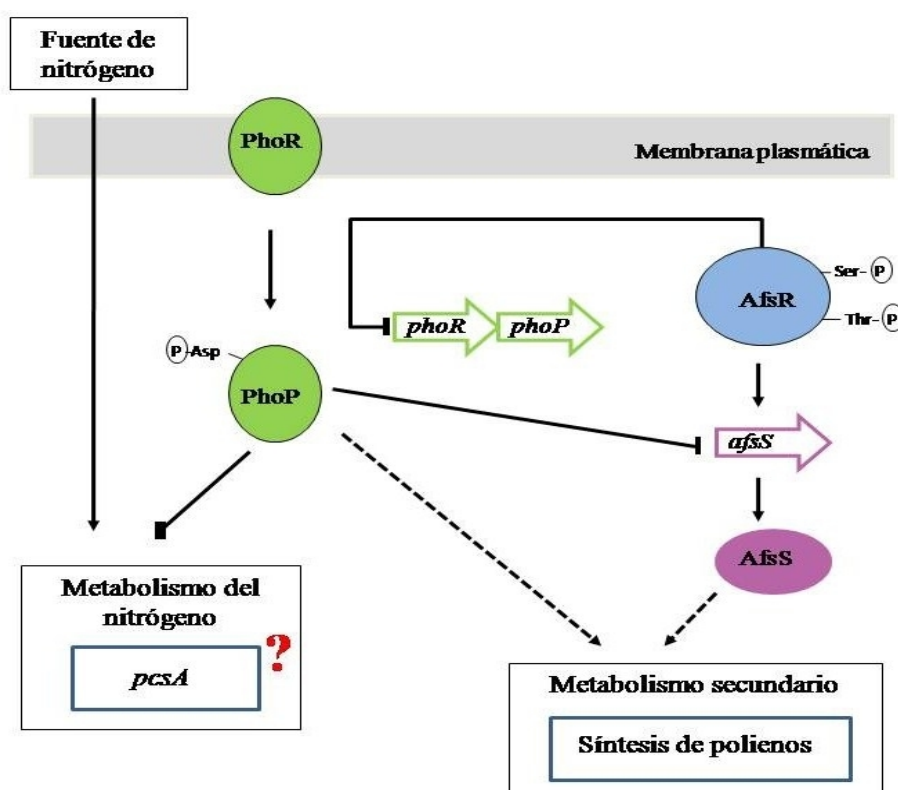


Figura 4.3: Mecanismo de regulación global, interacción de PhoP con metabolismo secundario y metabolismo del nitrógeno. Adaptado (Martin and Liras 2010).

5 CONCLUSIONES

1. La complementación del disruptante en *rimA* de *S. diastaticus* var 108 por parte de un módulo de carga exógeno requiera de la presencia de los dominios CoL y ACP.
2. La complementación del disruptante en *rimA* de *S. diastaticus* var 108 por parte del módulo de carga de *S. natalensis*, PimS0, restablece la producción únicamente de los polienos cuyo inicio biosintético deriva de la unidad iniciadora acetil-CoA, revelándose así que PimS0 tiene capacidad restrictiva para la biosíntesis de la cadena policetónica.
3. La complementación del disruptante en *rimA* de *S. diastaticus* var 108 por parte de los módulos de carga híbridos NysA-RimA, restablecen la producción de los polienos cuyo inicio biosintético deriva tanto de la unidad iniciadora acetil-CoA como butiril-CoA, poniéndose de manifiesto la flexibilidad en el reconocimiento de sustrato del dominio AT del módulo de carga de *S. noursei*, NysA, para la biosíntesis de la cadena policetónica.
4. El módulo de carga del *cluster* de biosíntesis de Rimocidina/CE-108 de *S. diastaticus* var. 108, *rimA*, es capaz de tomar como unidad iniciadora, propionil-CoA.
5. El módulo de elongación 13 del *cluster* de biosíntesis de Rimocidina/CE-108 de *S. diastaticus* var. 108, es capaz de tomar como unidad elongadora metilmalonil-CoA.
6. Los compuestos Rimocidina D y CE-108D son sustratos *in vivo* de la actividad amidotransferasa PcsA, originando los compuestos Rimocidina E y CE-108E.
7. La disminución en el número de carbonos de las cadenas laterales C₂ y C₂₇ del anillo macrocíclico originado por el *cluster* de biosíntesis de Rimocidina/CE-108, origina una disminución de la actividad antifúngica que es compensada ampliamente con la disminución de la actividad hemolítica.
8. La sustitución en PcsA de los residuos del 382 al 510 por los equivalentes de PcsB disminuye el reconocimiento de CE-108 a favor de Pimaricina, por lo que consideramos que algunos de estos residuos son relevantes para la especificidad de sustrato de dichas amidotransferasas.

9. El desacople temporal en la expresión de los genes *rimA* y *pcsA* en *S. diastaticus* var. 108 es responsable de la baja producción de polienos amidados en la cepa silvestre.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Adjou, K. T., R. Demaimay, et al. (1999). "MS-8209, a water-soluble amphotericin B derivative, affects both scrapie agent replication and PrPres accumulation in Syrian hamster scrapie." *J Gen Virol* **80** (Pt 4): 1079-85.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-402.
- Aparicio, J. F., A. J. Colina, et al. (1999). "The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. A new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes." *J Biol Chem* **274**(15): 10133-9.
- Aparicio, J. F., R. Fouces, et al. (2000). "A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*." *Chem Biol* **7**(11): 895-905.
- Aparicio, J. F., I. Molnar, et al. (1996). "Organization of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase." *Gene* **169**(1): 9-16.
- Austin, M. B. and J. P. Noel (2003). "The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases." *Nat Prod Rep* **20**(1): 79-110.
- Baginski, M. and J. Czub (2009). "Amphotericin B and its new derivatives - mode of action." *Curr Drug Metab* **10**(5): 459-69.
- Baginski, M., J. Czub, et al. (2006). "Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: molecular modeling studies." *Chem Rec* **6**(6): 320-32.
- Baginski, M., K. Sternal, et al. (2005). "Molecular modelling of membrane activity of amphotericin B, a polyene macrolide antifungal antibiotic." *Acta Biochim Pol* **52**(3): 655-8.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, et al. (2002). "Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2)." *Nature* **417**(6885): 141-7.
- Berdy, J. (2005). "Bioactive microbial metabolites." *J Antibiot (Tokyo)* **58**(1): 1-26.
- Bevitt, D. J., J. Cortes, et al. (1992). "6-Deoxyerythronolide-B synthase 2 from *Saccharopolyspora erythraea*. Cloning of the structural gene, sequence analysis and inferred domain structure of the multifunctional enzyme." *Eur J Biochem* **204**(1): 39-49.
- Binnie, C., M. Warren, et al. (1989). "Cloning and heterologous expression in *Streptomyces lividans* of *Streptomyces rimosus* genes involved in oxytetracycline biosynthesis." *J Bacteriol* **171**(2): 887-95.
- Birnboim, H. C. (1983). "A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA." *Methods Enzymol* **100**: 243-55.
- Borgos, S. E., H. Sletta, et al. (2006). "Effect of glucose limitation and specific mutations in the module 5 enoyl reductase domains in the nystatin and

- amphotericin polyketide synthases on polyene macrolide biosynthesis." Arch Microbiol **185**(3): 165-71.
- Brautaset, T., S. E. Borgos, et al. (2003). "Site-specific mutagenesis and domain substitutions in the loading module of the nystatin polyketide synthase, and their effects on nystatin biosynthesis in *Streptomyces noursei*." J Biol Chem **278**(17): 14913-9.
- Brautaset, T., P. Bruheim, et al. (2002). "Hexaene derivatives of nystatin produced as a result of an induced rearrangement within the *nysC* polyketide synthase gene in *S. noursei* ATCC 11455." Chem Biol **9**(3): 367-73.
- Brautaset, T., O. N. Sekurova, et al. (2000). "Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway." Chem Biol **7**(6): 395-403.
- Brown, M. G. M., A. Weston, et al. (1979). "transformation of *E.coli* C6000 by plasmid DNA at different phases of growth." FEMS microbiological letters **5**:219-222."
- Bruheim, P., S. E. Borgos, et al. (2004). "Chemical diversity of polyene macrolides produced by *Streptomyces noursei* ATCC 11455 and recombinant strain ERD44 with genetically altered polyketide synthase NysC." Antimicrob Agents Chemother **48**(11): 4120-9.
- Caffrey, P., J. F. Aparicio, et al. (2008). "Biosynthetic engineering of polyene macrolides towards generation of improved antifungal and antiparasitic agents." Curr Top Med Chem **8**(8): 639-53.
- Caffrey, P., S. Lynch, et al. (2001). "Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes." Chem Biol **8**(7): 713-23.
- Campelo, A. B. and J. A. Gil (2002). "The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570." Microbiology **148**(Pt 1): 51-9.
- Cane, D. E., C. T. Walsh, et al. (1998). "Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations." Science **282**(5386): 63-8.
- Coukell, A. J. and R. N. Brogden (1998). "Liposomal amphotericin B. Therapeutic use in the management of fungal infections and visceral leishmaniasis." Drugs **55**(4): 585-612.
- Croft, S. L., K. Seifert, et al. (2006). "Current scenario of drug development for leishmaniasis." Indian J Med Res **123**(3): 399-410.
- Cundliffe, E. (1978). "Mechanism of resistance to thiostrepton in the producing-organism *Streptomyces azureus*." Nature **272**(5656): 792-5.
- Cybulska, B., J. Bolard, et al. (1995). "Identification of the structural elements of amphotericin B and other polyene macrolide antibiotics of the heptean group influencing the ionic selectivity of the permeability pathways formed in the red cell membrane." Biochim Biophys Acta **1240**(2): 167-78.
- Czub, J., E. Borowski, et al. (2007). "Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes--a molecular dynamics study." Biochim Biophys Acta **1768**(10): 2616-26.
- Chater, K. F. (2006). "*Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1469): 761-8.

- Cheron, M., B. Cybulska, et al. (1988). "Quantitative structure-activity relationships in amphotericin B derivatives." Biochem Pharmacol **37**(5): 827-36.
- Chin, A. W. T. F., J. E. Thomas-Oates, et al. (2001). "Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains." Mol Plant Microbe Interact **14**(8): 1006-15.
- de Kruijff, B. and R. A. Demel (1974). "Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. 3. Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes." Biochim Biophys Acta **339**(1): 57-70.
- Donadio, S. and L. Katz (1992). "Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*." Gene **111**(1): 51-60.
- Donadio, S., M. J. Staver, et al. (1991). "Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis." Science **252**(5006): 675-9.
- Fernandez-Moreno, M. A., E. Martinez, et al. (1992). "Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin." J Biol Chem **267**(27): 19278-90.
- Floriano, B. and M. Bibb (1996). "*afsR* is a pleiotropic but conditionally required regulatory gene for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Mol Microbiol **21**(2): 385-96.
- Fresquet, V., J. B. Thoden, et al. (2004). "Kinetic mechanism of asparagine synthetase from *Vibrio cholerae*." Bioorg Chem **32**(2): 63-75.
- Gomez-Gomez, J. M., J. Blazquez, et al. (1996). "Hns mutant unveils the presence of a latent haemolytic activity in *Escherichia coli* K-12." Mol Microbiol **19**(4): 909-10.
- Gravius, B., T. Bezmalinovic, et al. (1993). "Genetic instability and strain degeneration in *Streptomyces rimosus*." Appl Environ Microbiol **59**(7): 2220-8.
- Hartsel, S. and J. Bolard (1996). "Amphotericin B: new life for an old drug." Trends Pharmacol Sci **17**(12): 445-9.
- Haydock, S. F., J. A. Dowson, et al. (1991). "Cloning and sequence analysis of genes involved in erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*: sequence similarities between EryG and a family of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases." Mol Gen Genet **230**(1-2): 120-8.
- Henderson, G., P. Krygsman, et al. (1987). "Characterization and structure of genes for proteases A and B from *Streptomyces griseus*." J Bacteriol **169**(8): 3778-84.
- Hopwood D.A. (2007) "*Streptomyces* in Nature and Medicine". Ed. Oxford University Press (New York)
- Hopwood, D. A., T. Kieser, et al. (1983). "Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66." J Gen Microbiol **129**(7): 2257-69.
- Hopwood, D. A., M.J. Bibb, et al. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual.

- Hopwood, D. A. and D. H. Sherman (1990). "Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis." Annu Rev Genet **24**: 37-66.
- Hopwood, D. A., T. Kieser, et al. (1986). "The Bacteria".
- Hopwood, D. A. and H. M. Wright (1976). "Genetic studies on SCP1-prime strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Gen Microbiol **95**(1): 107-20.
- Huang, F., S. F. Haydock, et al. (2005). "The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233: characterisation of an aminotransferase involved in the formation of 2-deoxystreptamine." Org Biomol Chem **3**(8): 1410-8.
- Huang, X., H. M. Holden, et al. (2001). "Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions." Annu Rev Biochem **70**: 149-80.
- Hutchinson, C. R. and I. Fujii (1995). "Polyketide synthase gene manipulation: a structure-function approach in engineering novel antibiotics." Annu Rev Microbiol **49**: 201-38.
- Hutchinson, E., B. Murphy, et al. "Redesign of Polyene Macrolide Glycosylation: Engineered Biosynthesis of 19-(O)-Perosaminyl- Amphoteronolide B." Chem Biol **17**(2): 174-182.
- Ikeda, H., J. Ishikawa, et al. (2003). "Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*." Nat Biotechnol **21**(5): 526-31.
- Janssen, G. R. and M. J. Bibb (1993). "Derivatives of pUC18 that have BglII sites flanking a modified multiple cloning site and that retain the ability to identify recombinant clones by visual screening of *Escherichia coli* colonies." Gene **124**(1): 133-4.
- Jarzebski, A., L. Falkowski, et al. (1982). "Synthesis and structure-activity relationships of amides of amphotericin B." J Antibiot (Tokyo) **35**(2): 220-9.
- Jones, D., H. J. Metzger, et al. (1944). "Control of Gram-Negative Bacteria in Experimental Animals by *Streptomycin*." Science **100**(2588): 103-105.
- Jonsson, N. N., R. J. Miller, et al. (2010). "Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus* (Boophilus) microplus populations with amitraz resistance." Vet Parasitol **169**(1-2): 157-64.
- Katz, L. and S. Donadio (1993). "Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics." Annu Rev Microbiol **47**: 875-912.
- Kelly, W. L., L. Pan, et al. (2009). "Thiostrepton biosynthesis: prototype for a new family of bacteriocins." J Am Chem Soc **131**(12): 4327-34.
- Kessler, H. A., J. Dixon, et al. (1981). "Effects of amphotericin B on hepatitis B virus." Antimicrob Agents Chemother **20**(6): 826-33.
- Khosla, C., R. McDaniel, et al. (1993). "Genetic construction and functional analysis of hybrid polyketide synthases containing heterologous acyl carrier proteins." J Bacteriol **175**(8): 2197-204.
- Kinashi, H. and M. Shimaji (1987). "Detection of giant linear plasmids in antibiotic producing strains of *Streptomyces* by the OFAGE technique." J Antibiot (Tokyo) **40**(6): 913-6.
- Kirby, K. S., E. Fox-Carter, et al. (1967). "Isolation of deoxyribonucleic acid and ribosomal ribonucleic acid from bacteria." Biochem J **104**(1): 258-62.

- Komaki, H., M. Izumikawa, et al. (2009). "Discovery of a pimarin analog JBIR-13, from *Streptomyces bicolor* NBRC 12746 as predicted by sequence analysis of type I polyketide synthase gene." Appl Microbiol Biotechnol **83**(1): 127-33.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Larson, J. L. and C. L. Hershberger (1986). "The minimal replicon of a streptomycete plasmid produces an ultrahigh level of plasmid DNA." Plasmid **15**(3): 199-209.
- Lau, J., D. E. Cane, et al. (2000). "Substrate specificity of the loading didomain of the erythromycin polyketide synthase." Biochemistry **39**(34): 10514-20.
- Leblond, P., G. Fischer, et al. (1996). "The unstable region of *Streptomyces ambofaciens* includes 210 kb terminal inverted repeats flanking the extremities of the linear chromosomal DNA." Mol Microbiol **19**(2): 261-71.
- Leblond, P., M. Redenbach, et al. (1993). "Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2)." J Bacteriol **175**(11): 3422-9.
- Lemke, A., A. F. Kiderlen, et al. (2005). "Amphotericin B." Appl Microbiol Biotechnol **68**(2): 151-62.
- Lezhava, A., T. Mizukami, et al. (1995). "Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*." J Bacteriol **177**(22): 6492-8.
- Li, K. K., W. T. t. Beeson, et al. (2007). "A convenient gHMQC-based NMR assay for investigating ammonia channeling in glutamine-dependent amidotransferases: studies of *Escherichia coli* asparagine synthetase B." Biochemistry **46**(16): 4840-9.
- Little, J. R., E. J. Plut, et al. (1978). "Relationship between the antibiotic and immunoadjuvant effects of amphotericin B methyl ester." Immunochemistry **15**(4): 219-24.
- MacNeil, D. J., K. M. Gewain, et al. (1992). "Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector." Gene **111**(1): 61-8.
- Malewicz, B., M. Momsen, et al. (1984). "Potentiation of antiviral activity of acyclovir by polyene macrolide antibiotics." Antimicrob Agents Chemother **25**(6): 772-4.
- Malpartida, F. and D. A. Hopwood (1984). "Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces antibiotic* and its expression in a heterologous host." Nature **309**(5967): 462-4.
- Malpartida, F. and D. A. Hopwood (1986). "Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2)." Mol Gen Genet **205**(1): 66-73.
- Martin, J. F. and P. Liras (2010). "Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*." Curr Opin Microbiol **13**(3): 263-73.
- Martin, M. F. and P. Liras (1989). "Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites." Annu Rev Microbiol **43**: 173-206.

- Mazierski, J. and E. Borowski (1995). "Molecular dynamics of amphotericin B I. Single molecule in vacuum and water." *Biophys Chem* **54**(1): 49-60.
- McDaniel, R., S. Ebert-Khosla, et al. (1993). "Engineered biosynthesis of novel polyketides." *Science* **262**(5139): 1546-50.
- Mendes, M. V., N. Anton, et al. (2005). "Characterization of the polyene macrolide P450 epoxidase from *Streptomyces natalensis* that converts de-epoxypimaricin into pimarinic." *Biochem J* **386**(Pt 1): 57-62.
- Mendes, M. V., J. F. Aparicio, et al. (2000). "Complete nucleotide sequence and characterization of pSNA1 from pimarinic-producing *Streptomyces natalensis* that replicates by a rolling circle mechanism." *Plasmid* **43**(2): 159-65.
- Mendes, M. V., E. Recio, et al. (2001). "Engineered biosynthesis of novel polyenes: a pimarinic derivative produced by targeted gene disruption in *Streptomyces natalensis*." *Chem Biol* **8**(7): 635-44.
- Mendez, C. and J. A. Salas (2001). "Altering the glycosylation pattern of bioactive compounds." *Trends Biotechnol* **19**(11): 449-56.
- Miranzo, D., E. M. Seco, et al (2010). "Isolation and characterization of *pcsB*, the gene for a polyene carboxamide synthase that tailors pimarinic into AB-400." *Appl Microbiol Biotechnol* **85**(6): 1809-19.
- Molnar, I., J. F. Aparicio, et al. (1996). "Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase." *Gene* **169**(1): 1-7.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard M38-P. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1998.
- Nedal, A. and S. B. Zotchev (2004). "Biosynthesis of deoxyaminosugars in antibiotic-producing bacteria." *Appl Microbiol Biotechnol* **64**(1): 7-15.
- Nosanchuk, J. D. (2006). "Current status and future of antifungal therapy for systemic mycoses." *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* **1**(1): 75-84.
- Odds, F. C., A. J. Brown, et al. (2003). "Antifungal agents: mechanisms of action." *Trends Microbiol* **11**(6): 272-9.
- Omura, S., H. Ikeda, et al. (2001). "Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12215-20.
- Oura, M., T. H. Sternberg, et al. (1955). "A new antifungal antibiotic, amphotericin B." *Antibiot Annu* **3**: 566-73.
- Pang, X., B. Aigle, et al. (2004). "Functional angucycline-like antibiotic gene cluster in the terminal inverted repeats of the *Streptomyces ambofaciens* linear chromosome." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(2): 575-88.
- Paquet, V. and E. M. Carreira (2006). "Significant improvement of antifungal activity of polyene macrolides by bisalkylation of the mycosamine." *Org Lett* **8**(9): 1807-9.

- Paquet, V., A. A. Volmer, et al. (2008). "Synthesis and in vitro biological properties of novel cationic derivatives of amphotericin B." Chemistry **14**(8): 2465-81.
- Pereda, A., R. G. Summers, et al. (1998). "The loading domain of the erythromycin polyketide synthase is not essential for erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*." Microbiology **144** (Pt 2): 543-53.
- Petkovic, H., J. Cullum, et al. (2006). "Genetics of *Streptomyces rimosus*, the oxytetracycline producer." Microbiol Mol Biol Rev **70**(3): 704-28.
- Ramos-Vega, A. L., Y. Davila-Martinez, et al. (2009). "SMb20651 is another acyl carrier protein from *Sinorhizobium meliloti*." Microbiology **155**(Pt 1): 257-67.
- Rawlings, B. J. (2001). "Type I polyketide biosynthesis in bacteria (Part A--erythromycin biosynthesis)." Nat Prod Rep **18**(2): 190-227.
- Risovic, V., M. Boyd, et al. (2003). "Effects of lipid-based oral formulations on plasma and tissue amphotericin B concentrations and renal toxicity in male rats." Antimicrob Agents Chemother **47**(10): 3339-42.
- Rodriguez, A. M., C. Olano, et al. (1995). "A cytochrome P450-like gene possibly involved in oleandomycin biosynthesis by *Streptomyces antibioticus*." FEMS Microbiol Lett **127**(1-2): 117-20.
- Saint-Julien, L., V. Joly, et al. (1992). "Activity of MS-8209, a nonester amphotericin B derivative, in treatment of experimental systemic mycoses." Antimicrob Agents Chemother **36**(12): 2722-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. , Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual., Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-7.
- Sanglard, D., F. Ischer, et al. (2003). "*Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2404-12.
- Santos-Beneit, F., A. Rodriguez-Garcia, et al. (2009). "Cross-talk between two global regulators in *Streptomyces*: PhoP and AfsR interact in the control of *afsS*, *pstS* and *phoRP* transcription." Mol Microbiol **72**(1): 53-68.
- Scofield, M. A., W. S. Lewis, et al. (1990). "Nucleotide sequence of *Escherichia coli asnB* and deduced amino acid sequence of asparagine synthetase B." J Biol Chem **265**(22): 12895-902.
- Scrutton, N. S., A. Berry, et al. (1990). "Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering." Nature **343**(6253): 38-43.
- Schwecke, T., J. F. Aparicio, et al. (1995). "The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7839-43.
- Seco, E. M., T. Cuesta, et al. (2005). "Two polyene amides produced by genetically modified *Streptomyces diastaticus* var. 108." Chem Biol **12**(5): 535-43.
- Seco, E. M., S. Fotso, et al. (2005). "A tailoring activity is responsible for generating polyene amide derivatives in *Streptomyces diastaticus* var. 108." Chem Biol **12**(10): 1093-101.

- Seco, E. M., D. Miranzo, et al. (2010). "The *pcsA* gene from *Streptomyces diastaticus* var. 108 encodes a polyene carboxamide synthase with broad substrate specificity for polyene amides biosynthesis." Appl Microbiol Biotechnol **85**(6): 1797-807.
- Seco, E. M., F. J. Perez-Zuniga, et al. (2004). "Starter unit choice determines the production of two tetraene macrolides, rimocidin and CE-108, in *Streptomyces diastaticus* var. 108." Chem Biol **11**(3): 357-66.
- Serre, L., E. C. Verbree, et al. (1995). "The *Escherichia coli* malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase at 1.5-Å resolution. Crystal structure of a fatty acid synthase component." J Biol Chem **270**(22): 12961-4.
- Shafiee, A. and C. R. Hutchinson (1987). "Macrolide antibiotic biosynthesis: isolation and properties of two forms of 6-deoxyerythronolide B hydroxylase from *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*)." Biochemistry **26**(19): 6204-10.
- Soler, L., P. Caffrey, et al. (2008). "Effects of new amphotericin analogues on the scrapie isoform of the prion protein." Biochim Biophys Acta **1780**(10): 1162-7.
- Southern, E. M. (1975). "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis." J Mol Biol **98**(3): 503-17.
- Stassi, D., S. Donadio, et al. (1993). "Identification of a *Saccharopolyspora erythraea* gene required for the final hydroxylation step in erythromycin biosynthesis." J Bacteriol **175**(1): 182-9.
- Szlinder-Richert, J., J. Mazerski, et al. (2001). "MFAME, N-methyl-N-D-fructosyl amphotericin B methyl ester, a new amphotericin B derivative of low toxicity: relationship between self-association and effects on red blood cells." Biochim Biophys Acta **1528**(1): 15-24.
- Taylor, R. G., D. C. Walker, et al. (1993). "*E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing." Nucleic Acids Res **21**(7): 1677-8.
- te Welscher, Y. M., H. H. ten Napel, et al. (2008). "Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane." J Biol Chem **283**(10): 6393-401.
- Valeriote, F., G. Medoff, et al. (1984). "Potentiation of cytotoxicity of anticancer agents by several different polyene antibiotics." J Natl Cancer Inst **72**(2): 435-9.
- Van Leeuwen, M. R., E. A. Golovina, et al. (2009). "The polyene antimycotics nystatin and filipin disrupt the plasma membrane, whereas natamycin inhibits endocytosis in germinating conidia of *Penicillium discolor*." J Appl Microbiol **106**(6): 1908-18.
- Vandeputte, P., G. Tronchin, et al. (2007). "Reduced susceptibility to polyenes associated with a missense mutation in the ERG6 gene in a clinical isolate of *Candida glabrata* with pseudohyphal growth." Antimicrob Agents Chemother **51**(3): 982-90.
- Vats, S., C. Stutter, et al. (1987). "Transductional analysis of chloramphenicol biosynthesis genes in *Streptomyces venezuelae*." J Bacteriol **169**(8): 3809-13.
- Vining, L. C. (1992). "Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity--a review." Gene **115**(1-2): 135-40.

- Vogtli, M., P. C. Chang, et al. (1994). "afsR2: a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*." Mol Microbiol **14**(4): 643-53.
- Volff, J. N. and J. Altenbuchner (1997). "Influence of disruption of the *recA* gene on genetic instability and genome rearrangement in *Streptomyces lividans*." J Bacteriol **179**(7): 2440-5.
- Volff, J. N. and J. Altenbuchner (1998). "Genetic instability of the *Streptomyces chromosome*." Mol Microbiol **27**(2): 239-46.
- Volff, J. N. and J. Altenbuchner (2000). "A new beginning with new ends: linearisation of circular chromosomes during bacterial evolution." FEMS Microbiol Lett **186**(2): 143-50.
- Volff, J. N., P. Viell, et al. (1997). "Artificial circularization of the chromosome with concomitant deletion of its terminal inverted repeats enhances genetic instability and genome rearrangement in *Streptomyces lividans*." Mol Gen Genet **253**(6): 753-60.
- Wallace, K. K., B. Zhao, et al. (1995). "In vivo analysis of straight-chain and branched-chain fatty acid biosynthesis in three actinomycetes." FEMS Microbiol Lett **131**(2): 227-34.
- Weber, J. M., J. O. Leung, et al. (1990). "Organization of a cluster of erythromycin genes in *Saccharopolyspora erythraea*." J Bacteriol **172**(5): 2372-83.
- Weber, J. M., J. O. Leung, et al. (1991). "An erythromycin derivative produced by targeted gene disruption in *Saccharopolyspora erythraea*." Science **252**(5002): 114-7.
- Weber, J. M., C. K. Wierman, et al. (1985). "Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*." J Bacteriol **164**(1): 425-33.
- Wenner, T., V. Roth, et al. (2003). "End-to-end fusion of linear deleted chromosomes initiates a cycle of genome instability in *Streptomyces ambofaciens*." Mol Microbiol **50**(2): 411-25.
- Woese, C. R. (1987). "Bacterial evolution." Microbiol Rev **51**(2): 221-71.
- Yanai, K. and T. Murakami (2004). "The kanamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces kanamyceticus*." J Antibiot (Tokyo) **57**(5): 351-4.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira, et al. (1985). "Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors." Gene **33**(1): 103-19.
- Yardley, V. and S. L. Croft (1997). "Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis." Antimicrob Agents Chemother **41**(4): 752-6.
- Yardley, V. and S. L. Croft (1999). "In vitro and in vivo activity of amphotericin B-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections." Am J Trop Med Hyg **61**(2): 193-7.
- Young, L. Y., C. M. Hull, et al. (2003). "Disruption of ergosterol biosynthesis confers resistance to amphotericin B in *Candida lusitanae*." Antimicrob Agents Chemother **47**(9): 2717-24.
- Zakrzewska-Czerwinska, J., D. Jakimowicz, et al. (2000). "Initiation of the *Streptomyces* chromosome replication." Antonie Van Leeuwenhoek **78**(3-4): 211-21.

- Zalkin, H. and J. L. Smith (1998). "Enzymes utilizing glutamine as an amide donor." Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol **72**: 87-144.
- Zhang, W., B. D. Ames, et al. (2006). "Engineered biosynthesis of a novel amidated polyketide, using the malonamyl-specific initiation module from the oxytetracycline polyketide synthase." Appl Environ Microbiol **72**(4): 2573-80.
- Zhong, Z., R. Caspi, et al. (2002). "A 50-kb plasmid rich in mobile gene sequences isolated from a marine micrococcus." Plasmid **47**(1): 1-9.

7 ANEXOS

Anexo I: Secuencia de nucleótidos correspondientes a los genes de PKSs híbridos:**Híbrido 2:**

ATGGTGCCCG	TCCACACAGC	TGACTACGTG	ATCCAGCCGC	CCACCGACGC
GGCGGAGGTA	CGGGGCGGCC	ACACGCTGCC	CGAGGTGTTC	GAGACCGCGT
CGAGGGCCGC	CCCCGACGCG	GTGGCCATCG	TGGACGGGGA	CCGTTTCGCGG
ACCTGGGCGC	AGTGGCGGGC	GGACGTCCGC	GCGCTGGCCC	GTGGCCTCCA
GGAATCGGGC	GTCGGGCCCC	GTGACGTGGT	GGCGGTGCGG	CTGCCGAACA
GCTGGGAGTT	CCAGACCCTG	CACCTGGCCG	TCGCGGCCGT	CGGCGCCGTA
CTGCTGCCCC	TCCACGAGGG	CACCCCACC	GCGGAGGTCC	ACGCGCTGCT
GACCCGCGCG	GAACCCGTAC	TCCTCGTCCT	GTCGGCTTCC	GGGAGCGAGG
GCACGGCAAC	GGCCCCGCTCG	CTCCTGGAGA	GCGTGCCGAC	GCTGCGCGGC
GTGCTGCTGG	CCGGGGCGTC	GGAGGCGGAG	TGCGAGGAGC	CGGGGATCGG
GGCGCTGGAC	GGGTTGCGGG	CAGCCTGGAC	GGGCAGCGAG	CCCCGGCCGG
TGCACCTCAC	CCCCGACATG	CCGCTCGCCC	TGATCCCCCTC	GTCCGGCACC
ACCTCGGCGC	GGCCCAAGCT	GTGCGTGCAC	ACCCACGGCG	GCCTGCTGGC
GAACACCGCG	GCCGTCGTGG	CCGATGCCGC	CGACGCCTTC	GGCGGCACGG
TCCTGACCGC	CTGCCCCGATG	ACCCACCTGT	TCGGGCTCCA	GTCCCTGCAC
ACGGCGCTGT	TCGCCGCCCG	GACGCAGGTC	CTGCTACCCG	GCTGGGACGT
GGACCGCTTC	CTGGAGCTGG	CGCGGGAGCA	CAACCCCCGC	GTCGTCTTCG
CCGTACCCGC	CCAACTGCGG	GACATCGTCG	CGCGACTCGC	CAGGGCGGGC
GAGCCGGCGG	GCTTCGCGCC	GCACCAGGTG	CGTACGGCGG	GCGCCGCCCT
CGCACCCGCG	CTCGCCGCAC	AGATACGCGC	CGCCCTCGAC	TGCGAACC GG
TCGTGGTGTG	GGGCATGTCC	GAGATCGGCA	CCGGCACCGC	AACCCGGGGC
CACCACCCCG	ACGGCAGCGT	GGGAGAACCG	GTCGACGGCG	TGCGCGTACG
GGTCGTGCGC	GAGCACGGCG	CGGAGTGCGC	GGCGGGGGAG	ACGGGCGAGC
TCCAGTACCA	GGGCCC GGCG	ATGTTCCGCG	GCTATTTCCG	CGAGCCGGAG
CTGACGCGCT	CGGCCCTCAC	CGACGACGGC	TGGCTGCGGA	CCGGCGACAT
CGCCGCCATC	GACGCGGACG	GCGTGGTTCG	CCTGCACGGC	CGGGCGGCCG
AAGTGATCGC	CACCGGAGGC	CGGAAGTTCG	GCGCCACCGA	AATCGAGAGC
CTGCTCGCGG	AGCTCGCGGG	CCTGGGCCCC	CTGGCCGTGG	CGGGGGCGCC
GGACGACCGG	CTCGGCGAGT	ACCCGTGCCT	GGTCGTGACC	GACCGCGCGG
ACCGTACGAT	CGGGCTGACC	GAGGTGACCG	CGTTCCTGCG	CCGGCGGGGA
CTCGCCGACC	ACAAGATCCC	CCTCGAACTG	GTCACCGTGC	GCGAGCTGCC
CTTCACCCCC	GCGGGGAAGC	TCGACCGCAG	GGCACTCAAG	GAGCAGCTGC
GCACCGGCCCT	GGAAGCGACG	CCCGTGCGCG	CCCGTCTCGG	CGCGGTCCCG
CCGGAGACGG	CCGAAGAGGC	GCTGGAAGT	GTACGCGACT	GCGTCGGCCA
GGTCCTCGGC	AGCAGCGGCG	ACCCGGCCCG	CCCCGCCGTC	GGTGCGCCCG
AATTCCCCGA	CACCGAATTC	CGCCGGCTCG	GCCTCGACTC	CGTCCTCGCG
GTGCGGCTGC	GCAACCTGCT	GCGGGAGGAG	ACCGGGCTGT	CCCTCCCGGT
CACGCTGGCC	TTCGACTTCC	CGACGCCGCG	GGCCGTGGCG	CACGCACTGG
CCGAGCAGAA	CGACCCGGCT	TCGGCGGGCG	CATCGGGGAA	GACGGCGGAG
GAGGCGCGGA	GGTTCCCGGC	CGACGAGGCC	GATCCGGTGG	CGATCGTCGC
CATGGCCTGC	CGCCTGCCGG	GCGGCGCCGA	CTCTCCCGAC	GCCCTGTGGG
AGCTGCTGGC	CGGCGGAACC	GACGCGATGC	GGCCCTTCCC	GGACGACCGC
GGCTGGGACC	TGGACCGCCT	CTTCGACGAG	GACCCCGACC	GGCCGGGCAC
CTGCTACGCA	CGCGAAGGCG	GCTTCCTGCC	CGGCGCGGGC	GACTTCGACG
CGGGCTTCTT	CGGCCTGTCC	GACCACGAGG	CGACGGCCAC	CGACCCGCAG
CAGCGCCTGC	TCCTGGTGGC	GGCCTGGGAG	ACCTTCGAGC	GGGCGGGCAT
CGACCCGGCG	TCCCTGAAGG	GCACCCGTAC	GGGCGTGTTC	ACCGGCGCGA
TGGAGCGCGG	CTACGGCGCT	CTCGCGTCCG	CCGTCCCCAG	CGAGTGGGAG
AGCACGCTCA	CCACCGGGGC	CGCCAACAGC	GCGATCTCCG	GGCGCATCGC

CTACACCTAC	GGCCTCGAAG	GCCCCGCGCT	GACCGTCGAC	ACCGCCTCCT
CGTCCTCCCT	CGTCGCCCTG	CACCTGGCCT	GCCGCTCCCT	GCGGTGCGGC
GAGACCGACC	TGGCGCTGGC	CGGCGGCGTC	ACCGTCATGG	CGACCCCGGC
GCCCTTCACC	CACTTCGCCC	GGCTGCGCGC	GCTCGCCACC	GACTCGCGCG
CCAAGGCGTA	CGCGGACACC	GCGAACGGCT	CCGCGTGGGC	GGAAGGCGCG
GGACTGCTGC	TGCTGGAGCG	GCTGAGCGAC	GCCCGCCGCA	ACGGACACCG
TGTACTGGCG	CTCGTACGGG	GCTCGGCGGT	CAACCAGGAC	GGCGCCTCCA
ACGGGCTCAC	CGCCCCGAGC	GGCCCCGCGC	AGCAGCGCGT	CATCCGCCAG
GCCCTGGCCG	ACGCCGGTCT	GACGCCGCGG	GACGTGGACG	CGGTGGAGGG
GCACGGCACC	GGCACTCCGC	TCGGCGACCC	GATCGAGGCC	CAGGCCCTGA
TGGCCACCTA	CGGCCAGGAG	CGGCCGGAGG	GACGGCCGCT	GTGGCTGGGG
TCGGTGAAGT	CCAACCTCGG	GCACACACAG	GCCGCTGCCG	GGGTCGTGCG
GGTCATCAAG	ACGGTGCTCG	CGCTGGGCCG	CGGCGTCCTG	CCCAGGACGC
TGCACGTGGA	GA T CCTTCC	ACCAAGGTCG	ACTGGTCCGC	CGGGGCGGTA
CGGCTGCTGA	CCGAGGCGCA	GCCCTGGCCC	CAGGAGAGCG	GGCACACGCG
GCGGGCAGGA	GTGTCGTCCT	TCGGGCTCAC	CGGCACCAAC	GCCCACGTGA
TCCTGGAGGA	GGCCCCGGAC	GGGACGCAGA	GCGCGCCCGG	ATCGGAACCG
GCCGACGACA	CCGCCGTACC	GTGGGTGCTC	TCCGCACGGA	GCCGGACGGC
GCTGCGCGAA	CAGGCCCGCC	GCCTGGCCGA	GCACGTGACC	GCTCACCCCG
GCCTGCGCAC	ACAGGACATC	GCCCACGCCC	TGGCCACCAC	CCGCACCCCG
CACCGGCACC	GGGCCGTCTG	CAGCGGCTCC	GACCGGGACC	GGATGCTGTC
CGCGACGGCC	GCGTTCGGGC	GCGGGGAGCG	GGCCGCGGAC	GTCACCCCGC
TCGATTCCGC	GCCGGGCGGC	CTGGCCTTCG	TCTTCTCCGG	ACAGGGCAGC
CAGCGCCCGG	GCATGGGCCG	CGAACTCGCC	GCCCGCTTCC	CGGTGTTTCG
CGACGCACTG	GACGACGCGC	TGCGCGCCCT	GGACCGGCAC	CTGGACGGCC
CGGTGCGCGA	GGTGATGTGG	GGCACCAGCG	CCGCGCTCCT	GGACCGGACC
GGCTGGACCC	AGCCCGCCCT	GTTTCGCCGT	GAGGTCGCCC	TCCACCGCCT
GGTCGCGTCC	CTCGGCGTCA	CCCCGACTT	CGTCGGCGGC	CACTCCGTGCG
GCGAGATCGC	CGCCGCCCAC	GTCGCCGGCG	TCCTGAGCCT	GGAGGACGCC
TGCCGCTTGG	TGGCCGCCCG	CGCCACGCTG	ATGCAGGCGC	TCCCGGCCCG
CGGCGCGATG	GCCGCGCTGG	AGGCCACCGA	GGACGAAGTG	GCCCCGCTGC
TCGGCGCACA	CCTCGCGCTG	GCCGCCGTCA	ACGGCCCCAC	CGCGGTGCTC
GTCGCCGGAG	CCGAGGACGC	CGTGCGGCAA	CTGACCGCCC	GCTTCGCCGA
CCGCGGCCGG	CGCACCAGCC	GGCTGGCCGT	CTCGCACGCC	TTCCACTCGC
CGCTGATGGA	GCCCATGCTC	GACGCCTTCC	GGGACGTCGT	GAGCCGACTG
ACCTTCCACC	AGCCGTCGAT	CCCGCTGGTC	TCCAACCTCA	CCGGTGAACCT
CGCCGGCAGT	GAGATCACCA	GCGCCGAGTA	CTGGGTCCGG	CACGTCCGCG
ACACCGTCCG	CTTCGCCGAC	GGCATCACCG	CACTGGCCAA	GGCCGGCGCC
GACGTCTCTA	TCGAACTCGG	CCCCGGCGGC	GTGCTGTCCG	CGATGGCCCG
CGACACCCTC	GGCCCCGACA	GCACCACCGA	CGTCGTCCCC	GCCCTGAGCA
AGGGACGGCC	CGAGGAGACC	GCCTTCGCCG	GCGCCCTCGG	CCGCCTGCAC
ACCCTCGGCG	TCCCCGTCTGA	CTGGCCCCGC	TTCTACGCCG	GCACCGGCGC
CCGCCGCGTC	GA ACT G C C C A	CCTACGCCTT	CCAGCACGTG	CGCCACTGGC
CCACCCCGCC	CCGCCCGAAC	GGCGCCGGGC	CCGGCGCCCT	CGGCCACCCC
CTGCTCGGCT	CCGCCGTCTGA	ACTCGCCGAC	GGCGGCGGCA	CCGTCTGCTC
CGGCGCCCTC	TCCCTCCGCA	CCCACCCCTG	GCTCGCCGAC	CACACCGTCG
CCGGGCGGGT	CGTGCTGCCG	GCCACCGCGC	TGCTGGAACCT	CGCCGTGCGC
GCCGGCGACG	AGGCGGGCTG	CGACGTCCTG	CACGAACTCC	ACCTCACACC
CCCGCCGGCC	CTGCCCCGACG	ACGCCGCCCT	GCACGTCCAG	GTGCACGTGCG
GCCCCGCCGA	CACCACCGGG	CGCCGCGCCG	TCACCGTCCA	CACCCGCCCC
GACCACCACC	CGGCCGCGCA	CTGGACCCGA	TGCGCCACCG	GCACCCTCGG
CAGCACCCCG	CCGTCCGCAG	CCGAAGCCGC	CACGGGCGGC	ACCCCGGCCG
CCTGGCCGCC	GGCCGACGCC	GAACCCCTCG	ACCTCGCCGA	CCACTACGAA

CGGCTCGCCG ACCGCGGCTT CGACTACGGC CCGACCTTCC GCGGCCTGCG
 GGCCGCTTGG CGACGCGGCG CGGAGATCTT CGCGGACGTG GAATGCCCCG
 CCGGCACCGC CGACGACGCC CCCGACCACG GACTGCACCC CGCCCTGCTC
 GACGCGGCCG GGCACGCCGC CATGGCGGTG GACGGCACCG TGCCCGTTCG
 CTGGCACGGC GTCCGGCTGC ACGCCGTCGG CGCCACCGCG CTGCGGGTCC
 GCATCCGCCC CACCACGACC GGCACGCTGA CCCTCACCGC GGTGACGTG
 CACGGCGCGC CGGTCTGTAC CGTCGAGGCC CTCACCGCCC GCCCGCTGAC
 CGACGAGGAA CGCGCCGCCG CGCGGACGCC GCGGCAGGCC CGCGGCGAGA
 CGCCCGCCGA CGCCCGCCCG GCCCGGCCCG CGGCGGCCCG CCCCGGCCCG
 GCCGGCGAAC CCCTCCCGGA CACCACCGGG TCCACCCCA CCGCCGGCCA
 CCTCGCCGCG CTGCCGCCGG CCGCCCGGGA GCGCCAGCTG CTGGACCTGG
 TGCGCACCCA GGCCGCCGCC GTCTTGGGCC ACCCCGGCCC CGAGGCCGTC
 GGCACCCGCA GCGTCTTCAA GGAGCTGGGC TTCGACTCGT TGGCCGGCGT
 CGAACTCGCC GACCGGCTCA CCGCCCGCAC CCGACTGCGC CTGCCGGCCA
 CCCTCGTCTT CAACTTCCCC ACCCCCGAAC GTGCTGCCCA CCGCCTCGGG
 GAACTCCTCG CCGCAACCGC CCCCCTCGAC CCCGGGGCGT ACGGAGAGGA
 ACTCACCAGG TTCGAGGCGA TCGTGACGAA CCTGCCGCGAG GACGGCCCCG
 AACGCCGGGC CGTCGCGGAC CGGTTGGACG CCATCGTCTC CGCACTCCGC
 CAGAACTCGC CTGCAGAGGT GCCCTCCTCG GACGAGGACA TCGACACGGT
 GTCGGTCGAC AGACTGCTCG ACATCATCGA TGAAGAGTTC GAAACCACAT
 AG

Híbrido 3:

ATGGTGCCCG TCCACACAGC TGAATACGTG ATCCAGCCGC CCACCGACGC
 GGCGGAGGTA CGGGGCGGCC ACACGCTGCC CGAGGTGTTC GAGACCGCGT
 CGAGGGCCGC CCCCAGCGCG GTGGCCATCG TGGACGGGGA CCGTTTCGCG
 ACCTGGGCGC AGTGGCGGGC GGACGTCCGC GCGCTGGCCC GTGGCCTCCA
 GGAATCGGGC GTCGGGCCCG GTGACGTGGT GGCAGTGCAG CTGCCGAACA
 GCTGGGAGTT CCAGACCCTG CACCTGGCCG TCGCGGCCGT CGGCGCCGTA
 CTGCTGCCCC TCCACGAGGG CACCCCGACC GCGGAGGTCC ACGCGCTGCT
 GACCCGCGCG GAACCCGTAC TCCTCGTCCT GTCGGCTTCC GGGAGCGAGG
 GCACGGCAAC GGCCCGCTCG CTCCTGGAGA GCGTGCCGAC GCTGCGCGGC
 GTGCTGCTGG CCGGGGCGTC GGAGGCGGAG TGCAGGAGC CGGGGATCGG
 GGCAGTGGAC GGGTTGCGGG CAGCCTGGAC GGCAGCGAG CCCCGGCCCG
 TGCACCTCAC CCCCAGCATG CCGCTCGCCC TGATCCCCTC GTCCGGCACC
 ACCTCGGCGC GGCCCAAGCT GTGCGTGCAC ACCACGGCG GCCTGTGGC
 GAACACCGCG GCCGTCTGG CCGATGCCGC CGACGCCTTC GGCGGCACGG
 TCCTGACCGC CTGCCCGATG ACCCACCTGT TCGGGCTCCA GTCCCTGCAC
 ACGGCGCTGT TCGCCGCCCG GACGCAGGTC CTGCTACCG GCTGGGACGT
 GGACCGCTTC CTGGAGCTGG CGCGGGAGCA CAACCCCGC GTCGTCTTCG
 CCGTACCCGC CCAACTGCGG GACATCGTCG CGCGACTCGC CAGGGCGGGC
 GAGCCGGCGG GCTTCGCGCC GCACCAGGTG CGTACGGCGG GCGCCGCCCT
 CGCACCCGCG CTCGCCGCAC AGATACGCGC CGCCCTCGAC TGCGAACCGG
 TCGTGGTGTG GGGCATGTCC GAGATCGGCA CCGGCACCGC AACCCGGGCC
 CACCACCCCG ACGGCAGCGT GGGAGAACCG GTCGACGGCG TCGCGGTACG
 GGTCGTGCGC GAGCACGGCG CGGAGTGCAG GCGGGGGGAG ACGGGCGAGC
 TCCAGTACCA GGGCCCGGCG ATGTTCCGCG GCTATTTCCG CGAGCCGGAG
 CTGACGCGCT CGGCCCTCAC CGACGACGGC TGGCTGCGGA CCGGCGACAT
 CGCCGCCATC GACGCGGACG GCGTGGTCTG CCTGCACGGC CGGGCGGCCG

AAGTGATCGC	CACCGGAGGC	CGGAAGTTCG	GCGCCACCGA	AATCGAGAGC
CTGCTCGCGG	AGCTCGCGGG	CCTGGGCCCG	CTGGCCGTGG	CGGGGGCGCC
GGACGACCGG	CTCGGCGAGT	ACCCGTGCCT	GGTCGTGACC	GACCGCGCGG
ACCGTACGAT	CGGGCTGACC	GAGGTGACCG	CGTTCCTGCG	CCGGCGGGGA
CTCGCCGACC	ACAAGATCCC	CCTCGAACTG	GTCACCGTGC	GCGAGCTGCC
CTTCACCCCC	GCGGGGAAGC	TCGACCGCAG	GGCACTCAAG	GAGCAGCTGC
GCACCGGCCT	GGAAGCGACG	CCCGTGCGCG	CCCGTCTCGG	CGCGGTCCCC
CCGGAGACGG	CCGAAGAGGC	GCTGGAAGT	GTACGCGACT	GCGTCGGCCA
GGTCCTCGGC	AGCAGCGGCG	ACCCGGCCGG	CCCCGCCGTC	GGTGCGCCGG
AATTCCCCGA	CACCGAATTC	CGCCGGCTCG	GCCTCGACTC	CGTTCCTCGC
GTGCGGCTGC	GCAACCTGCT	GCGGGAGGAG	ACCGGGCTGT	CCCTCCCGGT
CACGCTGGCC	TTCGACTTCC	CGACGCCGCG	GGCCGTGGCG	CACGCACTGG
CCGAGCAGAA	CGACCCGGCT	TCGGCGGCGG	CATCGGGGAA	GACGGCGGAG
GAGGCGCGGA	GGTTCCCGGC	CGACGAGGCC	GATCCGGTGG	CGATCGTCGC
CATGGCCTGC	CGCCTGCCGG	GCGGCGCCGA	CTCTCCCGAC	GCCCTGTGGG
AGCTGCTGGC	CGGCGGAACC	GACGCGATGC	GGCCCTTCCC	GGACGACCGC
GGCTGGGACC	TGGACCGCCT	CTTCGACGAG	GACCCCGACC	GGCCGGGCAC
CTGCTACGCA	CGCGAAGGCG	GCTTCCTGCC	CGGCGCGGGC	GACTTCGACG
CGGGCTTCTT	CGGCCTGTCC	GACCACGAGG	CGACGGCCAC	CGACCCGCAG
CAGCGCCTGC	TCCTGGTGGC	GGCCTGGGAG	ACCTTCGAGC	GGGCGGGCAT
CGACCCGGCG	TCCCTGAAGG	GCACCCGTAC	GGGCGTGTTC	ACCGGCGCGA
TGGAGCGCGG	CTACGGCGCT	CTCGCGTCCG	CCGTCCCCAG	CGAGTGGGAG
AGCACGCTCA	CCACCGGGGC	CGCCAACAGC	GCGATCTCCG	GGCGCATCGC
CTACACCTAC	GGCCTCGAAG	GCCCCGCGCT	GACCGTCGAC	ACCGCCTCCT
CGTCCTCCCT	CGTCGCCCTG	CACCTGGCCT	GCCGCTCCCT	GCGGTGCGGC
GAGACCGACC	TGGCGCTGGC	CGGCGGCGTC	ACCGTCATGG	CGACCCCGGC
GCCCTTCACC	CACTTCGCCC	GGCTGCGCGC	GCTCGCCACC	GACTCGCGCG
CCAAGGCGTA	CGCGGACACC	GCGAACGGCT	CCGCGTGGGC	GGAAGGCGCG
GGACTGCTGC	TGCTGGAGCG	GCTGAGCGAC	GCCCGCCGCA	ACGGACACCG
TGTACTGGCG	CTCGTACGGG	GCTCGGCGGT	CAACCAGGAC	GGCGCCTCCA
ACGGGCTCAC	CGCCCCGAGC	GGCCCCGCGC	AGCAGCGCGT	CATCCGCCAG
GCCCTGGCCG	ACGCCGTCT	GACGCCGCGG	GACGTGGACG	CGGTGGAGGG
GCACGGCACC	GGCACTCCGC	TCGGCGACCC	GATCGAGGCC	CAGGCCCTGA
TGGCCACCTA	CGGCCAGGAG	CGGCCGAGG	GACGGCCGCT	GTGGCTGGGG
TCGGTGAAAGT	CCAACCTCGG	GCACACACAG	GCCGCTGCCG	GGGTCGTGCG
GGTCATCAAG	ACGGTGCTCG	CGCTGGGCCG	CGGCGTCCTG	CCCAGGACGC
TGCACGTGGA	GA CTCCTTCC	ACCAAGGTCG	ACTGGTCCGC	CGGGGCGGTA
CGGCTGCTGA	CCGAGGCGCA	GCCCTGGCCC	CAGGAGAGCG	GGCACACGCG
GCGGGCAGGA	GTGTCGTCCT	TCGGGCTCAC	CGGCACCAAC	GCCCACGTGA
TCCTGGAGGA	GGCCCCGGAC	GGGACGCAGA	GCGCGCCCGG	ATCGGAACCG
GCCGACGACA	CCGCCGTACC	GTGGGTGCTC	TCCGCACGGA	GCCGGACGGC
GCTGCGCGAA	CAGGCCCGCC	GCCTGGCCGA	GCACGTGACC	GCTCACCCCG
GCCTGCGCAC	ACAGGACATC	GCCCACGCCC	TGGCCACCAC	CCGCACCCGG
CACCGGCACC	GGGCCGTCTG	CAGCGGCTCC	GACCGGGACC	GGATGCTGTC
CGCGACGGCC	GCGTTCGGGC	GCGGGGAGCG	GGCCGCGGAC	GTCACCCCGC
TCGATTCCGC	GCCGGGCGGC	CTGGCCTTCG	TCTTCTCCGG	ACAGGGCGGC
CAGCACCCCC	GCATGGGGCG	CGGGGCGGCC	GAGGCGTTCC	CCGTGTTCCG

```

GGAGGCGCTG CGCGAGGTGT GCGACACCCT CGACCCGCTG CTGGCACGTC
CGCTGACCTC GGTGATGTGG GCGGACGCCG ACTCCGAGGA GGCGACGCTG
CTGCACAACG CCGAGTTCTC GCAGCCCTCG CTGTTGCCCC TCCAGGTGCG
CCTCTACCGG CTGTACGAGT CCTGGGGCAT GGCCCCGGAC CGTCTCGCGG
GCCATTTCGGC CGGCGAGATC GCCGCCGCGC ATGTCACCGG CATCCTCACC
CTCCAGGACG CCTGCGCCCT GGTGGCCTCC CGGGGCAGGC TGATCAGCTC
GCTGCCGGTC GGCGGCGCGA CGGTGGCGGT GCGCATCTCG GAGGACGAGG
TGCGGGGGTG GCTCGCCGAG GAGACGACCG GCTCGGTCTC GATCGCGGCC
GTCAACGGGC CGCACTCCCT CGTACTCTCC GGTGCCGAGG CCCCCTCAT
CGCCCTCACG GACCGGCTCC GCGACGCCGG CCACAAGACC CACCGCATCC
CCATGAGGGT CGCGGCCAC TCACCGCTGA TGGACCCCAT CCTGGGGGAG
TTCCGCGCGG TCGTCCGCAC GCTGGCCTAC GGCACGCCCA CCATCCCCCT
CGTCTCCACC GTCACCGGCC GCCCGCTGAC CGACGAGGAG GCGCGCGACC
CTGAGCACTG GGTACGGCAC GTGCGGCGGC CCGTGCGCTT CAAGGACGCG
ATCGGCCGGC TCCGGGAGGA GCGCGTCACC GGCTTCCTGG AGCTGGGCGC
CGAGCCGCTG CTCACCCCA TGATCGACGA GTGCCTGGAG GCGGCCGGCC
CGCAGCACGG AACCGCCGTG GTGCCGAGCC TGAGCTCCGG CGTACCGGAC
CGGCAGATCC TGCTCTCCGC GGCCGCCCGG GTGCACACCC ACGGCGCACC
CGTCGACTGG CCCGCCTTCT ACGCCGGCAC CGGCGCCCGC CGCGTCGAAC
TGCCACCTA CGCCTTCCAG CACGTGCGCC ACTGGCCAC CCCGCCCGC
CCGAACGGCG CCGGGCCCGG CGCCCTCGGC CACCCCTGC TCGGCTCCGC
CGTCGAACTC GCCGACGGCG GCGGCACCGT CTGCTCCGGC GCCCTCTCCC
TCCGCACCCA CCCCTGGCTC GCCGACCACA CCGTCGCCGG GCGGGTCGTG
CTGCCGGCCA CCGCGCTGCT GGAATCGCC GTGCGCGCCG GCGACGAGGC
GGGCTGCGAC GTCCTGCACG AACTCCACCT CACCACCCCG CCGGCCCTGC
CCGACGACGC CGCCCTGCAC GTCCAGGTGC ACGTCGGCCC CGCCGACACC
ACCGGGCGCC GCGCCGTCAC CGTCCACACC CGCCCCGACC ACCACCCGGC
CGGCGACTGG ACCCGATGCG CCACCGGCAC CCTCGGCAGC ACCCCGCCGT
CCGCAGCCGA AGCCGCCACG GGCGGCACCC CGGCCGCTG GCCGCCGGCC
GACGCCGAAC CCCTCGACCT CGCCGACCAC TACGAACGGC TCGCCGACCG
CGGCTTCGAC TACGGCCCAG CCTTCCGCGG CCTGCGGGCC GCCTGGCGAC
GCGGCGCGGA GATCTTCGCG GACGTGGAAT GCCGCCCCGG CACCGCCGAC
GACGCCCCCG ACCACGGA CTGCTCGACG CGGCCCGGCA
CGCCGCCATG GCGGTGGACG GCACCGTGCC CGTCGCCTGG CACGGCGTCC
GGGTGCACGC CGTCGGCGCC ACCGCGCTGC GGGTCCGCAT CCGCCCCACC
ACGACCGGCA CGCTGACCCT CACCGCGGTC GACGTGCACG GCGCGCCGGT
CGTCACCGTC GAGGCCCTCA CCGCCGCCC GCTGACCGAC GAGGAACGCG
CCGCCCCGCG GACGCCGCGG CAGGCCGCG GCGAGACGCC CGCCGACGCC
CGCCCGGCC GGCCCGCGGC GGCCCGCCC GGCCCGGCC GCGAACCCCT
CCCGGACACC ACCGGGTCCC ACCCCACCGC CGGCCACCTC GCCGCGCTGC
CGCCGGCCGC CCGGGAGCGC CAGCTGCTGG ACCTGGTGCG CACCCAGGCC
GCCGCCGTCC TGGGCCACCC CGGCCCGAG GCCGTCGGCA CCCGACGCGT
CTTCAAGGAG CTGGGCTTCG ACTCGTTGGC CGGCGTCGAA CTCGCCGACC
GGCTCACCGC CCGCACCGGA CTGCGCCTGC CGGCCACCCT CGTCTTCAAC
TTCCCCACCC CCGAACGTGC TGCCCACCGC CTCGGGGAAC TCCTCGCCGC
AACCGCCCC CTGACCCCCG GGGCGTACGG AGAGGAACTC ACCAGGTTTCG
AGGCGATCGT GACGAACCTG CCGCAGGACG GCCCCGAACG CCGGGCCGTC

```

```

GCGGACCGGT TGGACGCCAT CGTCTCCGCA CTCCGCCAGA ACTCGCCTGC
AGAGGTGCCC TCCTCGGACG AGGACATCGA CACGGTGTCTG GTCGACAGAC
TGCTCGACAT CATCGATGAA GAGTTCGAAA CCACATAGAG AAATTGTTGC
TTTCGTTTCG GACCCGATGA CGAGGACGGA CCGATGCAGG AACCCAGCA
AGGCCAGCCG GACCAGCAGG AGAAAATCGT CGACTATCTC CGGCGGGTCA
CTTCAGATCT TCGCCGTGCC CGCCGCCGCA TTGGCGAACT GGAATCCAAG
GACAACGAGC CCATCGCCAT CGTCGGAATG GGCTGCCGAC TTCCCGGCGG
CGTCAATTCT CCGGAATCCC TGTGGGACCT GGTGCGTTCC GGCGGCGACG
CCATTTCCGG ATTCCCCGTC GACCGCGGCT GGGACCTGGA AACCTCACC
GGAAACGGCG ACGGCAGCAG CGCCACCCAC GAAGGCGGAT TCCTCTACGA
CGCCGCGG

```

Anexo II: Secuencia de nucleótidos correspondientes a los genes de amidotransferasa híbridos:

Híbrido P1:

```

ATGTGCGGAA TCTCCGGCTG GCTCGCGTTC GACCGCGACC TGACCAAAGA
GCAGGCGACG GTGGACGCGA TGACCGGGAC CATGGCCTAC CGGGGCCCCG
ACGCCGGGGG CACCTGGGTG GACCGGCACG TGGCACTCGG CCACCGCCGC
CTGGCGGTGA TCGACATCGA GGGCGGCACG CAGCCGATGC GTGTCGACAC
CCCCAACGGC CCGGTGGCCA TCACCTACAG CGGCGAGGTG TACAACTTCA
CCGAGCTGCG CGAGGAACTG CGTCGTACAG GCCACCGCTT CCGGACGGCG
AGCGACACCG AGGTCGTGCT GCGCGGATAC CTGCAGTGGG GCGAGGCACT
GGCCGACCGG CTCAACGGCA TGTACGCCTT CGCGATCTGG GACTCCCGGA
ACGAGAAGCT CGTCATGATC CGCGACCGGA TGGGCATCAA GCCCTTCTAC
TTCCACCCCA CCGCCGACGG CGTGCTGTTT GGCTCGGAGC CCAAGGCCAT
CCTGGCCCAC CCGATGTTCA AGCGGGTGAT CGAAGCCGAC GGCCTGTTCTG
AGCTGCTGAG CGTGTGCAAG ACGCCGGGAC ATGCGATCTG GTCCGACATG
CGCGAGGTCC GGCCGGGCGAG CCTCGTGGTG GTCGACCGCG CCGGTCTACG
CGAGCGGACG TACTGGAAGC TGACGACCCA GGAGCACACC GACGACCGGG
ACACCACGGT CACCAAGATC CGTGAGCTGC TCGAAGACAT CGTGCGGCGC
CAGCTCGTCG CGGACGTGCC GCAATGCGTG CTGCTCTCGG GCGGGCTGGA
CTCCAGCTCG CTCACGGCGC TGGCCGCGCG GGAGCTGGCC GCTCAGGGCG
AGAAGGTGCG CAGCTTCTCC GTCGACTTCG AAGGGCTGGC CGACAACCTC
CGCCCCGACG ACATGCGGGC CACCCCGGAC TCGCCGTTCTG TGCACGACGT
GGCCGACCAC GTCGGCTCGC TGCACGAGGA CATCGTGCTG CCCCACACCG
CGCTCACCAG TCTTGACGCG CGCAGGGCAG TCATGGCCGC GAAGGACTTC
CCCAGCGGCA TCGCCGACGT GGACGTATCG CTGTACAAGC TGTTACGGC
GATCCGCGAG CACTCCACGG TCGCGCTCTC CCGTGAGACG GCGGACGAAC
TCTTCGGCGG CTACCCGTGG TTCCGGGACC CCGTGGCGCA GCGCGCCGGT
ATCTTCCCGT GGATAATCCC CGTGATGTCC GCGTGGACCA AGGCGAACCC
GAAGGGGGCG CTCCACCCGG ACCTGGTGGC CAACAACGGC CTGGTGACGT
ACCTCAAGGA CCGGTACAGC GAAGCGGTTG CCGAAGTCGA GGTGCTGCCC
GGGGAGGACG AAAACGAGCG GCGCATGCGT GTCATGAGCC ACCTGCATCT

```

CACCCGGTTC CTCCAGATGC TGCTCGACCG CAAGGACCGG ATCAGCATGG
CGGTTCGGCCT GGAGGTCCGG GTGCCGTACT GCGACCACCG GCTGGTGGAG
TACGTCTACA ACACCCCGTG GGCATGAAG AGCTTCGACG GCAGGGAGAA
GAGCCTGCTC CGCGCAGCCG CCGGCGATCT GCTCCCGCGC TCGGTGGTGG
AGCGGCTGAA GAGCCCCTAC CCGTCCACCC AGGACGCGCG CTACGCGAGC
GGGCTGCAGC AGATGGGCAA GCAGCTGCTC TCCGAGCAGG ACCACCCGAT
CTTCCAGGTC GTCACGCGGA CCACGATCGA CGAGATGGTG AAGCTGGACC
CGGCAGCCAT GCCCGGCCCC GCGCGCGAGC AGCTCGACCG AATGATCGAC
ATCGCCACCT GGATGGACAT GCACCAGCCG GACATCCGAG TGGCCGGATC
C

Híbrido P2:

ATGTGTGGAA TCTCCGGCTG GCTCGCTTTC GACCACGACC TGACCAAAGA
GCAGGCGACG GTGGACGCGA TGACCGACAC CATGGCCTAC CGGGGCCCCG
ACGGCAGGGG CACCTGGGTG GACCGGCACG TGGCACTCGG CCACCGCCGG
CTGGCGGTGA TCGACATCGA GGGCGGCACG CAGCCGATGC GTGTCGACAC
CCCTAACGGC CCGGTGGTCA TCACCTACAG CGGCGAGGCG TACAACTTCA
CCGAACCTGCG CGAGGAGCTG CGCCGCCGCG GCCACCGCTT CCGGACGTCC
AGCGACACCG AGGTGGTGCT GCACGCCTAC CTGGAGTGGG GCGAGGCCAT
GGCCGACCGC CTCAACGGCA TGTACGCCTT CGCGATCTGG GACGCCCGGA
GCGAGAAGCT GGTCATGATC CGTGACCGGA TGGGCATCAA GCCCTTCTAC
TTCCACCCCA CCGCCGACGG TGTGCTCTTC GGCTCGGAGC CCAAGGCCAT
CCTGGCCAC CCGATGTTCA AGCGGGTGAT CGACGCCGAG GGCCTGTTTCG
AGCTGCTGAG CGTGTGCAAG ACGCCGGGGA ACGCCATCTG GTCCGACATG
CGCGAGGTCC GGCCGGGCGAG CCTCGTGGTG GTCGACCGCT CCGGTGTGCG
CGAGCGGACG TACTGGAAGC TGGAGTCCCG GGAGCACACC GACGACCTGG
ACACCACGAT CGCCACGATC CGTGACCTGC TCGGCGACAC CGTGCGGCGC
CAGCTCGTCG CGGACGTGCC GCAATGCGTG CTGCTCTCGG GCGGACTGGA
CTCCAGCTCG ATCACGGCGC TGTCCGCGCG GGAGCTGGCC GCGCACGGCG
AGAAGGTGCG CAGCTTCTCC GTCGACTTCG TCGGGCTGGC CGACAACTTC
CGGCCCCGACA ACATGCGGGC CACCCCGGAC TCGCCGTTTCG TGCACGACGT
GGCCGATCAC GTCGGCTCCC TGCACGAGGA CATCGTGCTG CCCACACCG
CGCTCACC GA CCGGACGCG CGCAGGGCGG TCCTGGCGGC CAAGGACTTC
CCCAGCGGCC TCGCCGACGT GGACGTATCG CTGTACATGC TGTTC AAGGC
GATCCGCGAG CACTCCACGG TCGCGCTCTC CCGTGAGACG GCGGACGAGC
TCTTCGGCGG CTACCCGTGG TTCCAGGACC CCGTGGCGCA GCGCGCCGGC
ATCTTCCCGT GGATGGTCCC CGTGCTGTCC GAGTGGTCCA AGGCGAACGC
GCTGGGGCTG CTCAACCCGG ACCTGATCGC CATGAGTGAC CTGGGGACGT
ACGTCAAGGA CCGGTACAGC GAGGCGGTTCG CCGGCGTCGA GCCGTTGCCC
GGGGAGGACG TACAGGAACG GCGCATGCGC GTCATGTCCC ATCTGCACCT
CACCCGGTTC CTCCAGGTGC TGCTCGACCG CAAGGACCGR MTSAGCATGG
CGGTTCGGCCT GGAGGTCCGG GTGCCGTACT GCGACCACCG GCTGGTGGAG
TACGTCTACA ACACCCCGTG GGCATGAAG AGCTTCGACG GCCGGGAGAA
GAGCCTGCTC CGCGCGGCCG CCGGCGATCT GCTCCCGCGA TCGGTGGTGG
AACGCCTGAA GAGCCCCTAC CCGTCCACCC AGGACCCGGG CTACGCGGGC
GGACTCCAGC AGATGGGCAA GCAACTGCTC TCCGAGCCGG ACCATCCGAT

CTTCCAGCTG GTGACCCGCG CATCGCTCGA CAAGATGGTG AACTTGGACC
 CGGCGAAGAT GCCGGACGCC ATCCGCGAGC AGCTCGACCG GATGATGGAC
 ATCGCGACCT GGCTGGAGAT GTATCAACCG GAGATCCGGA TGTCTGA

Híbrido P3:

ATGTGCGGAA TCTCCGGCTG GCTCGCGTTC GACCGCGACC TGACCAAAGA
 GCAGGCGACG GTGGACGCGA TGACCGGGAC CATGGCCTAC CGGGGCCCCG
 ACGCCGGGGG CACCTGGGTG GACCGGCACG TGGCACTCGG CCACCGCCGC
 CTGGCGGTGA TCGACATCGA GGGCGGCACG CAGCCGATGC GTGTCGACAC
 CCCC AACGGC CCGGTGGCCA TCACCTACAG CGGCGAGGTG TACA ACTTCA
 CCGAGCTGCG CGAGGAACTG CGTCGTCACG GCCACCGCTT CCGGACGGCG
 AGCGACACCG AGGTCGTGCT GCGCGGATAC CTGCAGTGGG GCGAGGCACT
 GGCCGACCGG CTCAACGGCA TGTACGCCTT CGCGATCTGG GACTCCCGGA
 ACGAGAAGCT CGTCATGATC CGCGACCGGA TGGGCATCAA GCCCTTCTAC
 TTCCACCCCA CCGCCGACGG CGTGCTGTTC GGCTCGGAGC CCAAGGCCAT
 CCTGGCCAC CCGATGTTCA AGCGGGTGAT CGAAGCCGAC GGCCTGTTG
 AGCTGCTGAG CGTGTGCAAG ACGCCGGGAC ATGCGATCTG GTCCGACATG
 CGCGAGGTCC GGCCGGGCGAG CCTCGTGGTG GTCGACCGCG CCGGTCTACG
 CGAGCGGACG TACTGGAAGC TGACGACCCA GGAGCACACC GACGACCGGG
 ACACCACGGT CACCAAGATC CGTGAGCTGC TCGAAGACAT CGTGCGGCGC
 CAGCTCGTCG CGGACGTGCC GCAATGCGTG CTGCTCTCGG GCGGACTGGA
 CTCCAGCTCG ATCACGGCGC TGTCCGCGCG GGAGCTGGCC GCGCACGGCG
 AGAAGGTGCG CAGCTTCTCC GTCGACTTCG TCGGGCTGGC CGACA ACTTC
 CGGCCCGACA ACATGCGGGC CACCCCGGAC TCGCCGTTCG TGCACGACGT
 GGCCGATCAC GTCGGCTCCC TGCACGAGGA CATCGTGCTG CCCCACACCG
 CGCTCACCGA CCCC GACGCG CGCAGGGCGG TCCTGGCGGC CAAGGACTTC
 CCCAGCGGCC TCGCCGACGT GGACGTATCG CTGTACATGC TGTTC AAGGC
 GATCCGCGAG CACTCCACGG TCGCGCTCTC CGGTGAGACG GCGGACGAGC
 TCTTCGGCGG CTACCCGTGG TTCCAGGACC CGGTGGCGCA GCGCGCCGGC
 ATCTTCCCGT GGATGGTCCC CGTGCTGTCC GAGTGGTCCA AGGCGAACGC
 GCTGGGGCTG CTCAACCCGG ACCTGATCGC CATGAGTGAC CTGGGGACGT
 ACGTCAAGGA CCGGTACAGC GAGGCGGTG CCGGCGTCGA GCCGTTGCCC
 GGGGAGGACG TACAGGAACG GCGCATGCGC GTCATGTCCC ATCTGCACCT
 CACCCGGTTC CTCCAGGTGC TGCTCGACCG CAAGGACCGR MTSAGCATGG
 CGGTCGGCCT GGAGGTCCGG GTGCCGTACT GCGACCACCG GCTGGTGGAG
 TACGTCTACA ACACCCCGTG GCGGATGAAG AGCTTCGACG GCAGGGAGAA
 GAGCCTGCTC CGCGCAGCCG CCGGCGATCT GCTCCCGCGC TCGGTGGTGG
 AGCGGCTGAA GAGCCCCTAC CCGTCCACCC AGGACGCGCG CTACGCGAGC
 GGGCTGCAGC AGATGGGCAA GCAGCTGCTC TCCGAGCAGG ACCACCCGAT
 CTTCCAGGTC GTCACGCGGA CCACGATCGA CGAGATGGTG AAGCTGGACC
 CGGCAGCCAT GCCCGGCCCC GCGCGCGAGC AGCTCGACCG AATGATCGAC
 ATCGCCACCT GGATGGACAT GCACCAGCCG GACATCCGAG TGGCCGGATC
 C

Híbrido P4:

ATGTGCGGAA TCTCCGGCTG GCTCGCGTTC GACCGCGACC TGACCAAAGA

GCAGGCGACG GTGGACGCGA TGACCGGGAC CATGGCCTAC CGGGGCCCCG
 ACGCCGGGGG CACCTGGGTG GACCGGCACG TGGCACTCGG CCACCGCCGC
 CTGGCGGTGA TCGACATCGA GGGCGGCACG CAGCCGATGC GTGTCGACAC
 CCCC AACGGC CCGGTGGCCA TCACCTACAG CGGCGAGGTG TACAACTTCA
 CCGAGCTGCG CGAGGAACTG CGTCGTCACG GCCACCGCTT CCGGACGGCG
 AGCGACACCG AGGTCGTGCT GCGCGGATAC CTGCAGTGGG GCGAGGCACT
 GGCCGACCGG CTCAACGGCA TGTACGCCTT CGCGATCTGG GACTCCCGGA
 ACGAGAAGCT CGTCATGATC CGCGACCGGA TGGGCATCAA GCCCTTCTAC
 TTCCACCCCA CCGCCGACGG CGTGCTGTTC GGCTCGGAGC CCAAGGCCAT
 CCTGGCCAC CCGATGTTCA AGCGGGTGAT CGAAGCCGAC GGCCTGTTTCG
 AGCTGCTGAG CGTGTGCAAG ACGCCGGGAC ATGCGATCTG GTCCGACATG
 CGCGAGGTCC GGCCGGGCGAG CCTCGTGGTG GTCGACCGCG CCGGTCTACG
 CGAGCGGACG TACTGGAAGC TGACGACCCA GGAGCACACC GACGACCGGG
 ACACCACGGT CACCAAGATC CGTGAGCTGC TCGAAGACAT CGTGCGGCGC
 CAGCTCGTCG CGGACGTGCC GCAATGCGTG CTGCTCTCGG GCGGACTGGA
 CTCCAGCTCG ATCACGGCGC TGTCCGCGCG GGAGCTGGCC GCGCACGGCG
 AGAAGGTGCG CAGCTTCTCC GTCGACTTCG TCGGGCTGGC CGACAACTTC
 CGGCCCGACA ACATGCGGGC CACCCCGGAC TCGCCGTTCG TGCACGACGT
 GGCCGATCAC GTCGGCTCCC TGCACGAGGA CATCGTGCTG CCCCACACCG
 CGCTCACC GA CCGCCGACGCG CGCAGGGCGG TCCTGGCGGC CAAGGACTTC
 CCCAGCGGCC TCGCCGACGT GGACGTATCG CTGTACATGC TGTTC AAGGC
 GATCCGCGAG CACTCCACGG TCGCGCTCTC CGGTGAGACG GCGGACGAGC
 TCTTCGGCGG CTACCCGTGG TTCCGGGACC CGGTGGCGCA GCGCGCCGGT
 ATCTTCCCGT GGATAATCCC CGTGATGTCC GCGTGGACCA AGGCGAACCC
 GAAGGGGGCG CTCCACCCGG ACCTGGTGCG CAACAACGGC CTGGTGACGT
 ACCTCAAGGA CCGGTACAGC GAAGCGGTTG CCGAAGTCGA GGTGCTGCCC
 GGGGAGGACG AAAACGAGCG GCGCATGCGT GTCATGAGCC ACCTGCATCT
 CACCCGGTTC CTCCAGATGC TGCTCGACCG CAAGGACCGG ATCAGCATGG
 CGGTCCGGCT GGAGGTCCGG GTGCCGTACT GCGACCACCG GCTGGTGGAG
 TACGTCTACA ACACCCCGTG GGCGATGAAG AGCTTCGACG GCCGGGAGAA
 GAGCCTGCTC CGCGCGGCCG CCGGCGATCT GCTCCCGCGA TCGGTGGTGG
 AACGCCTGAA GAGCCCTAC CCGTCCACCC AGGACCCGGG CTACGCGGGC
 GGACTCCAGC AGATGGGCAA GCAACTGCTC TCCGAGCCGG ACCATCCGAT
 CTTCCAGCTG GTGACCCGCG CATCGCTCGA CAAGATGGTG AACTGGACC
 CGGCGAAGAT GCCGGACGCC ATCCGCGAGC AGCTCGACCG GATGATGGAC
 ATCGCGACCT GGCTGGAGAT GTATCAACCG GAGATCCGGA TGTCCTGA

